



# Impacts histo-morphologiques et biochimiques de la mutation laurina sur les graines et les plantules de *Coffea arabica* L.

Sophie Adler

## ► To cite this version:

Sophie Adler. Impacts histo-morphologiques et biochimiques de la mutation laurina sur les graines et les plantules de *Coffea arabica* L.. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2014. Français. NNT : 2014LARE0027 . tel-01187531

**HAL Id: tel-01187531**

**<https://theses.hal.science/tel-01187531>**

Submitted on 27 Aug 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LA REUNION

Faculté des Sciences et Technologies

Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé (E.D.S.T.S-542)

## THESE

Présentée à l'Université de La Réunion pour obtenir le

### DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Discipline : Biologie végétale

UMR Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

Institut de Recherche pour le Développement

# **Impacts histo-morphologiques et biochimiques de la mutation *laurina* sur les graines et les plantules de *Coffea arabica* L.**

Par

**Sophie ADLER**

Soutenue le 12 décembre 2014 devant le jury d'examen composé de :

<b>M. DRON</b> , Professeur, Université Paris Sud-Orsay	Rapporteur
<b>D. ROLIN</b> , Professeur, Université Bordeaux II	Rapporteur
<b>G. CONEJERO</b> , Ingénieur de Recherche, INRA, Montpellier	Examineur
<b>A. CHARRIER</b> , Professeur Emérite, SupAgro, Montpellier	Examineur
<b>M. NICOLE</b> , Directeur de Recherche, IRD, Montpellier	Examineur
<b>B. REYNAUD</b> , Chargé de Recherches HDR, CIRAD La Réunion	Examineur
<b>I. FOCK-BASTIDE</b> , HDR, Université de La Réunion	Co-Directrice de Thèse
<b>M. NOIROT</b> , Directeur de Recherche, IRD, La Réunion	Directeur de Thèse



UNIVERSITE DE LA REUNION

Faculté des Sciences et Technologies

Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé (E.D.S.T.S-542)

## THESE

Présentée à l'Université de La Réunion pour obtenir le

### DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Discipline : Biologie végétale

UMR Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

Institut de Recherche pour le Développement

# **Impacts histo-morphologiques et biochimiques de la mutation *laurina* sur les graines et les plantules de *Coffea arabica* L.**

Par

**Sophie ADLER**

Soutenue le 12 décembre 2014 devant le jury d'examen composé de :

<b>M. DRON</b> , Professeur, Université Paris Sud-Orsay	Rapporteur
<b>D. ROLIN</b> , Professeur, Université Bordeaux II	Rapporteur
<b>G. CONEJERO</b> , Ingénieur de Recherche, INRA, Montpellier	Examineur
<b>A. CHARRIER</b> , Professeur Emérite, SupAgro, Montpellier	Examineur
<b>M. NICOLE</b> , Directeur de Recherche, IRD, Montpellier	Examineur
<b>B. REYNAUD</b> , Chargé de Recherches HDR, CIRAD La Réunion	Examineur
<b>I. FOCK-BASTIDE</b> , HDR, Université de La Réunion	Co-Directrice de Thèse
<b>M. NOIROT</b> , Directeur de Recherche, IRD, La Réunion	Directeur de Thèse



# Remerciements

*Les travaux de recherche qui font l'objet de ce manuscrit se sont déroulés au sein de l'UMR PVBMT dans le cadre d'une bourse ministérielle. Je remercie M. Bernard Reynaud pour m'avoir hébergée au CIRAD de St-Pierre pendant mes 3 ans. Je remercie vivement l'IRD et son équipe pour m'avoir apporté un soutien logistique et financier pour les expériences et missions.*

*J'aimerais tout particulièrement remercier Michel Noirot, mon directeur de thèse, de m'avoir accueillie à La Réunion. Vous m'avez guidée dans mes travaux, sachant attiser ma curiosité scientifique. Vous avez été extrêmement présent et patient tout au long de ma thèse ; vous m'avez appris à valoriser mes résultats tant sous forme d'articles que de posters à l'occasion de congrès. Et vous avez réussi à me réconcilier avec les stats !! J'espère rester à l'image de votre formation dans mon avenir et devenir chercheur.*

*Isabelle Fock-Bastide, je te remercie de ton implication dans ma thèse à tous les stades. Ta gentillesse et ta bonne humeur malgré toutes tes responsabilités m'ont apporté baume au cœur et m'ont permis de tenir dans les moments de doute. Tes critiques ont toujours été constructives et tu as su également orienter mes recherches. Je ressortais de toutes nos réunions avec une motivation et une sérénité à toute épreuve. Et pour moi tu as été un maître de recherche!*

*Je tenais également à remercier les équipes de Métropole qui m'ont accueillie pour que je puisse réaliser mes expériences : la plateforme PHIV du CIRAD à Montpellier au sein de l'équipe de Jean-Luc Verdeil avec Geneviève Conéjéro ; l'INRA de Versailles au sein d'IJPB avec Grégory Mouille et Sylvie Citerne. Vos aides ont été précieuses quand j'étais sur place et quand j'étais de retour sur La Réunion.*

*Je souhaite aussi remercier André Charrier pour ses bons conseils.*

*Je remercie également Tony Palama pour son aide sur des expériences à St-Denis et sa disponibilité par mail (quand je ne me trompais pas d'adresse...). Bonne continuation !*

*Maintenant, viennent les remerciements dédiés aux personnes formidables que j'ai rencontrées à La Réunion, qui y sont encore ou qui en sont reparties. En souvenir des pauses café, repas, soirées, randos et papotages... C'est aussi grâce à vous que j'ai pris plaisir à vivre à La Réunion et à venir travailler tous les jours : Sandrine, Coline et Emeric, Sandrine A, David, Maéva, Pierre, Quentin et Bertrand, Yann, Alex, Marion, Stéphanie J, Stéphanie D, Pauline, K'li, Yvane, Mik, Marie, Julien, Véro. Merci Mathilde pour ta bonne humeur perpétuelle et pour avoir pris soin de moi par des petites attentions adorables. Un clin d'œil tout particulier pour les doctorants : Oriane, Princesse Sisi, Max, Morquen, Maéva, Sasa et Noura. Je vous souhaite bon courage. J'ai été aussi contente de partager des discussions avec chercheurs et techniciens du CIRAD.*

*Je remercie aussi mes voisins de bureau qui ont assisté à mes discussions houleuses avec mon ordinateur : Toulassi pour m'avoir écoutée (surtout lorsque je râlais !) et pour m'avoir donné de très bons conseils (la thèse est un générateur .....); MiniChef pour m'avoir appris pleins de choses sur les bestioles, montré des graphes bizarres (je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse. C'est bientôt fini, tiens-bon !); Maud, ma nouvelle voisine depuis peu, bienvenue et profite de ces 3 ans, ca passe très vite.*

*Jess, Laeti (« Aréoport de Nice, Aréoport de Nice, deux minutes d'arrêt »), nos jeudis soirs resteront mémorables et les lendemains difficiles aussi ! Les lutins n'auront jamais été aussi actifs que depuis qu'on s'est connues !! Les randos-campings et les fous-rires dans les tentes ont été d'anthologie (j'en ai encore mal aux abdos aujourd'hui !).*

*Lydia (ton rire m'a suivi jusqu'ici), Audrey (vis et aime!) et Emilie (courage pour ta thèse), je ne vous oublie pas et vous m'avez manqué tout au long de cette aventure réunionnaise. Mébarek, je suis contente de t'avoir croisé au détour d'un microscope !*

*Alice, notre amitié a commencé le soir de mon arrivée par le film « 7 vies » et depuis elle n'a jamais failli ! Nos midis sushis sont incontournables et les guets-apens fréquents (heureusement que la fontaine à eau était là !!). Nous avons passé de très bons moments ensemble. Merci d'avoir été là quand le moral flanchait et d'avoir trouvé les mots pour que je prenne du recul sur des situations pas très faciles. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite et c'est un « challenge » que je te donne !*

*Je remercie Estelle Jaligot et Alain Rival pour m'avoir donné ma chance en stage de master 1. Merci Estelle d'avoir su trouver les mots pour me donner confiance en moi et pour m'avoir transmis la fibre de la recherche. J'ai énormément apprécié nos pauses café lorsque j'étais de retour pour des missions à Montpellier tout au long de la thèse.*

*Enfin, citée en dernier mais primordiale pour moi, elle prend une place toute particulière dans mon cœur. Je remercie tout particulièrement ma famille. Mes cousins, Bertrand (et sa petite famille) et Vincent, en souvenir de nos années passées et pour nos vies futures. Vincent, nous avons passé des moments formidables dans le coucou des îles ! Merci à tous d'être venus me voir sur mon caillou. Ca m'a fait un bien fou ! A toi, Myriam, à toi Jean-Pierre, je ne vous oublie pas et vous êtes présents en permanence avec moi. Maman, Papa, vous avez toujours été là pour moi. Merci pour votre soutien durant toutes mes études. Vous m'avez appris à être curieuse tout au long de ma vie, vous m'avez soutenue quand j'étais perdue, vous m'avez aidée à me relever lorsque j'affrontais des difficultés : c'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Les mots sont trop faibles pour vous dire ce que je ressens, le plus fort que j'ai trouvé est de vous dire que je vous aime. Cette thèse, je vous la dédie, elle est pour vous.*

# *Table des matières*

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des publications et communications

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique ..... 4

I. Les caféiers ..... 4

I.1 Classification générale ..... 4

I.2 Principales caractéristiques génétiques des caféiers ..... 5

I.2.a Structure du génome..... 5

I.2.b Mode de reproduction et barrières reproductives ..... 5

I.2.c Phylogénie des caféiers ..... 6

I.3 Diversité des caféiers ..... 7

I.3.a Morphologique ..... 7

I.3.b Phénologique..... 9

I.4 *Coffea arabica* ..... 10

I.5 Mutation *laurina* ..... 11

I.5.a Caractéristiques phénotypiques..... 13

I.5.b Caractéristiques biochimiques ..... 14

II. Le développement histologique et morphologique du fruit, de la graine et de la  
plantule..... 14

II.1 Fruit & Graine ..... 14

II.2 Plantule ..... 17

III. Structure des parois végétales: les sucres pariétaux ..... 18

III.1 La paroi primaire ..... 19

III.1.a Structure de la cellulose..... 20

III.1.b Structure des hémicelluloses ..... 20

III.1.c Structure des pectines ..... 22

III.2 La paroi secondaire ..... 24

III.3 Les polysaccharides de la paroi cellulaire (PPC) du caféier ..... 25

III.3.a Les galactomannanes ..... 25

III.3.b Les arabinogalactanes ..... 26

III.3.c Les autres polysaccharides ..... 27



<b>IV. Deux composés biochimiques : l'acide chlorogénique et la caféine.....</b>	<b>28</b>
IV.1 Acides chlorogéniques .....	28
IV.1.a Généralités.....	28
IV.1.b Voie de biosynthèse .....	30
IV.1.c Localisation in situ .....	31
IV.1.d Localisation et expression des gènes.....	32
IV.1.e Accumulation des acides chlorogéniques .....	32
IV.2 La caféine .....	33
IV.2.a Voie de biosynthèse .....	34
IV.2.b La teneur en caféine dans la graine .....	35
IV.2.c Dans les cultures cellulaires .....	36
IV.2.d Dans la plantule.....	37
IV.3 Complexe CAF-CQA.....	39
 <b>Chapitre II : Description du fruit et de la graine au cours de son</b>	
<b>développement chez Bourbon et Bourbon Pointu.....</b>	<b>41</b>
<b>I. Impacts morphologiques et histologiques de la mutation <i>laurina</i> sur la fructification</b>	
<b>et les caractéristiques de la graine chez <i>C. arabica</i> L.....</b>	<b>42</b>
I.1 Problématique .....	42
I.2 Méthodologie .....	43
I.3 Résultats .....	44
I.4 Discussion .....	46
<b>II. Evolution de la composition en MPC et PPC de la graine de café au cours de son</b>	
<b>développement .....</b>	<b>48</b>
II.1 Problématique .....	48
II.2 Méthodologie.....	48
II.3 Résultats.....	49
II.4 Discussion.....	50
<b>III Evolution des teneurs en caféine et en acide chlorogénique au cours du</b>	
<b>développement de la graine de <i>C. arabica</i> 'Laurina'. .....</b>	<b>52</b>
III.1 Problématique.....	52
III.2 Méthodologie .....	52
III.3 Résultats .....	52
III.4 Discussion .....	52
Article 1 : Morphological and histological impacts of the <i>laurina</i> mutation on fructification	
and seed characteristics in <i>Coffea arabica</i> L. ....	54
Article 2 : Evolution of cell wall composition in monosaccharides over seed development	
in <i>Coffea arabica</i> . Comparison between <i>Coffea arabica</i> 'Bourbon' and <i>Coffea arabica</i>	
'Laurina' .....	66

Article 3 : Evolution of seed caffeine and chlorogenic acid contents over development in <i>Coffea arabica</i> ‘Laurina’ .....	84
<b>Chapitre III : Caractérisation des plantules de Bourbon et Bourbon Pointu.....</b>	<b>89</b>
<b>I. La lumière est impliquée dans l’expression de la mutation <i>laurina</i> chez <i>C. arabica</i> L. Impacts sur le semi-nanisme, le nombre de cellules et les profils hormonaux dans les hypocotyles .....</b>	<b>90</b>
I.1 Problématique .....	90
I.2 Méthodologie .....	90
I.3 Résultats .....	91
I.4 Discussion .....	92
<b>II. Comparaison de plantules B et BP poussant à la lumière ou à l’obscurité au niveau de la composition en monosaccharides pariétaux et des teneurs en CAF et CQA.....</b>	<b>94</b>
II.1 Problématique .....	94
II.2 Méthodologie.....	94
II.3 Résultats.....	95
II.4 Discussion.....	96
Article 1 : Daylight is directly implied in the expression of the <i>laurina</i> mutation in <i>Coffea arabica</i> L. Impact on semi-dwarfism, cell number and hormonal profiles in hypocotyls .....	98
Article 2 : Comparison between seedlings of <i>Coffea arabica</i> L. ‘Laurina’ and ‘Bourbon’ growing in daylight or darkness for their monosaccharidic cell wall composition and their caffeine and chlorogenic acid contents. ....	112
<b>Chapitre IV : Conclusions et perspectives .....</b>	<b>126</b>
<b>I. Conclusions.....</b>	<b>126</b>
I.1 De nouvelles connaissances sur les fruits et les graines de <i>C. arabica</i> .....	126
I.2 La mutation <i>laurina</i> a un impact sur la l’histo-morphologie et la biochimie des graines au cours du développement.....	127
I.3 L’effet de la lumière sur la plantule de BP : caractérisation du semi-nanisme des hypocotyles.....	127
<b>II Perspectives.....</b>	<b>128</b>
II.1. La caractérisation de la CAF, du CQA et du chlorogénate de caféine.....	128
II.2. Etude de l’expression des gènes potentiellement touchée par la mutation <i>laurina</i>	130
II.3. Etude de la sensibilité de BP à la lumière .....	131
<b>III. Conclusion générale.....</b>	<b>131</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>132</b>



## Liste des abréviations

<b>3-CQA</b>	Acide caféoyl-3-quinique
<b>4-CQA</b>	Acide caféoyl-4-quinique
<b>5-CQA</b>	Acide caféoyl-5-quinique
<b>3,4-diCQA</b>	Acide dicaféoyl-3,4-quinique
<b>3,5-diCQA</b>	Acide dicaféoyl-3,5-quinique
<b>4,5-diCQA</b>	Acide dicaféoyl-4,5-quinique
<b>3-FQA</b>	Acide féruloyl-3-quinique
<b>4-FQA</b>	Acide féruloyl-4-quinique
<b>5-FQA</b>	Acide féruloyl-5-quinique
<b>ACG</b>	Acides chlorogéniques
<b>Ara</b>	Arabinose
<b>AIR</b>	Résidu insoluble dans l'alcool
<b>B</b>	<i>Coffea arabica</i> L var. 'Bourbon'
<b>BP</b>	<i>Coffea arabica</i> L. var. 'Bourbon Pointu'
<b>CAF</b>	Caféine
<b>CQAs</b>	Acides caféoylquiniques
<b>diCQAs</b>	Acides dicaféoylquiniques
<b>FQAs</b>	Acides féruloylquiniques
<b>FT</b>	Temps de fructification
<b>Fuc</b>	Fucose
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GC/MS</b>	Chromatographie gazeuse avec spectométrie de masse
<b>Glu</b>	Glucose
<b>HG</b>	Homogalacturonane
<b>HPAEC-PAD</b>	Chromatographie à haute performance échangeuse d'anion avec détection ampérométrique pulsée
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide à haute performance

<b>Man</b>	Mannose
<b>MF</b>	Masse fraîche
<b>MPC</b>	Monosaccharide de la paroi cellulaire
<b>MS</b>	Masse sèche
<b>PAL</b>	Phenylalanine ammonia-lyase
<b>PPC</b>	Polysaccharide de la paroi cellulaire
<b>Rha</b>	Rhamnose
<b>RG-I</b>	Rhamnogalacturonane I
<b>RG-2</b>	Rhamnogalacturonane II
<b>SAF</b>	Semaines après floraison
<b>SAM</b>	S-adénosyl-L-méthionine
<b>TAG</b>	Triacylglycérols
<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>Xyl</b>	Xylose

# Liste des figures

## Chapitre I

---

<b>Figure 1</b> : Feuilles de différentes espèces de caféiers (Photos : S. Adler) .....	8
<b>Figure 2</b> : Fleurs de différentes espèces de caféiers (Photos : S. Adler) .....	8
<b>Figure 3</b> : Fruits de caféiers illustrant la diversité de forme et de couleur du péricarpe. De gauche à droite : <i>C. kapakata</i> , <i>C. arabica</i> , <i>C. pocsii</i> Bridson, <i>C. canephora</i> (Photos : S. Adler & O. Lavogez).....	9
<b>Figure 4</b> : Les grandes étapes de l'histoire de la Caféiculture.....	11
<b>Figure 5</b> : <i>C. arabica</i> BP (Photo. Coopérative Bourbon Pointu) .....	13
<b>Figure 6</b> : Coupe transversale et longitudinale de fruit de caféier (Source : <a href="http://www.sweetmarias.com/defects_seedstructure/defects_seedstructure.html">http://www.sweetmarias.com/defects_seedstructure/defects_seedstructure.html</a> ) .....	15
<b>Figure 7</b> : Les changements de tissus durant le développement et la maturation de fruit de café. (D'après Salmona et al., 2008). e : endosperme ; ps : périsperme ; pc : péricarpe, JAF : jour après floraison.....	17
<b>Figure 8</b> : A : Graine de B après germination (19 jours après semis), B : Plantule de B (20 jours après semis), C : Plantule de B (65 jours après semis) (Photo : S. Adler) .....	18
<b>Figure 9</b> : Structure de la paroi végétale d'après Roland (1980). S1, S2 et S3 représentent les couches de la paroi secondaire et sont caractérisées par l'orientation des microfibrilles de cellulose.....	19
<b>Figure 10</b> : La paroi primaire (Cosgrove, 2005) .....	20
<b>Figure 11</b> : Structure d'un xyloglucane de <i>Solanaceae</i> (D'après : <a href="http://www.cerc.uga.edu/~mao/wallmab/Hemicel/hemi.htm">http://www.cerc.uga.edu/~mao/wallmab/Hemicel/hemi.htm</a> ) .....	21
<b>Figure 12</b> : Structure d'un xylane (Source : <a href="http://www.cerc.uga.edu/~mao/wallmab/Hemicel/hemi.htm">http://www.cerc.uga.edu/~mao/wallmab/Hemicel/hemi.htm</a> ) .....	22
<b>Figure 13</b> : Structure d'un galactoglucomannane (Source : <a href="http://www.cerc.uga.edu/~mao/wallmab/Hemicel/hemi.htm">http://www.cerc.uga.edu/~mao/wallmab/Hemicel/hemi.htm</a> ) .....	22
<b>Figure 14</b> : Structure d'un HG.....	22
<b>Figure 15</b> : Structure d'un RG-I de <i>Solanum tuberosum</i> d'après (ØBro et al., 2004). (a) galactane linéaire, (b) arabinogalactane I, (c) arabinane branché et (d) arabinane putatif avec un branchement galactane. ....	23

<b>Figure 16</b> : Structure de RG-II. La chaîne principale est ramifiée avec quatre types de chaînes latérales (Source : <a href="http://www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/projects/RGII.htm">http://www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/projects/RGII.htm</a> , Centre for carbohydrate chemistry, University of East Anglia, Royaume-Uni) .....	24
<b>Figure 17</b> : Structure de l'arabinane d' <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	24
<b>Figure 18</b> : Structure d'un galactomannane de café (Moreira et al., 2012).....	26
<b>Figure 19</b> : Structure putative d'un arabinogalactane d'une graine de café mature (Redgwell et al., 2002 ; Nunes et al., 2008).....	27
<b>Figure 20</b> : Acides chlorogéniques (ACG) des caféiers .....	30
<b>Figure 21</b> : Voie de biosynthèse des ACG .....	31
<b>Figure 22</b> : Molécule de caféine .....	34
<b>Figure 23</b> : Voie de biosynthèse de la caféine (1) 7-méthylxanthosine synthase (xanthosine N-méthyltransférase) ; (2) N-méthylnucléosidase ; (3) théobromine synthase (monométhylxanthine N-méthyltransférase) ; (4) caféine synthase (diméthylxanthine N-méthyltransférase) (Adapté de Ashihara et al., 2008) .....	34

## Chapitre II

---

<b>Figure 1</b> : Périodes, phases et stades caractérisant le développement du fruit de B et BP .....	47
---	----

# Liste des publications et communications

---

## Publications dans des revues scientifiques à comité de lecture

**Adler S, Verdeil J, Lartaud M, Fock-Bastide I, Joët T, Conéjéro G, & Noirot M (2014).** Morphological and histological impacts of the *laurina* mutation on fructification and seed characteristics in *Coffea arabica* L. *Trees*.

**Adler S, Verdeil JL, Conéjéro G, Fock-Bastide I, Zaharia LI, Sarrazin A, Hoareau J, Noirot M.** Daylight is directly implied in the expression of the *laurina* mutation in *Coffea arabica* L. Impact on semi-dwarfism, cell number and hormonal profiles in hypocotyls, (Soumis, *Plant Physiology and Biochemistry*).

**Adler S, Mouille G, Fock-Bastide I, Palama T, Citerne S, Noirot M.** Cell wall composition in monosaccharides of *Coffea arabica* L. seedlings growing under daylight or darkness. Putative relation with caffeine and chlorogenic acid. Comparison between *Coffea arabica* 'Bourbon' and *Coffea arabica* 'Laurina'. (En correction)

**Adler S, Mouille G, Citerne S, Fock-Bastide I, Noirot M.** Evolution of cell wall composition in monosaccharides over seed development in *Coffea arabica*. Comparaison between *Coffea arabica* 'Bourbon' and *Coffea arabica* 'Laurina'. (En correction)

**Adler S, Mouille G, Citerne S, Fock-Bastide I, Noirot M.** Evolution of caffeine and chlorogenic acid over development in *Coffea arabica* 'Laurina' seed. (En rédaction)

---

## Posters

**Adler S, Citerne S, Fock-Bastide I, Mouille G, Noirot M (2014)** Effect of the mutation *laurina* on the monosaccharide composition of cell walls in *Coffea arabica* seedlings in relation with daylight or darkness growth condition. The 5<sup>th</sup> International Conference Plant Cell Wall Biology, Palm Cove, Australia, 27-31 Juillet

**Adler S, Citerne S, Palama T, Fock-Bastide I, Mouille G & Noirot M (2013)** Effect of the mutation *laurina* on the monosaccharide composition of cell walls in *Coffea arabica* seeds from the fertilization to the harvest. The 6<sup>th</sup> Cell Wall Meeting, Nantes, France, 7-12 Juillet



## Introduction générale

La culture du café, la transformation, le commerce, le transport et la commercialisation fournissent des emplois pour des centaines de millions de personnes à travers le monde. Le café est crucial pour de nombreux pays en développement et peut représenter plus de 50% de leur économie. C'est l'une des boissons les plus consommées au monde. Après l'Allemagne et l'Italie, la France est le plus gros importateur de café en Europe avec 6.8 millions de sacs en 2012 (<http://www.ico.org>). Parmi les nombreuses espèces de caféiers, seules deux espèces sont à l'origine de plus de 99% de la production de café : *Coffea arabica* Linné et *C. canephora* Pierre. *C. arabica* représente environ 65% de la production mondiale. Il est particulièrement apprécié des consommateurs pour son goût doux et aromatique. Il est cultivé en Afrique et en Amérique latine à moyenne altitude (de 200 m à 2000 m). Les principaux pays cultivateurs sont en Amérique Centrale et du Sud, mais le café le plus apprécié provient de l'Afrique de l'Est (Ethiopie, Kenya). Concernant *C. canephora*, il est à l'origine d'un café fort et amer et pousse à basse altitude en Afrique, en Amérique et en Asie. Les principaux pays producteurs sont le Vietnam, le Brésil et l'Indonésie. Il présente une meilleure résistance à la rouille (*Hemileia vastatrix*).

*C. arabica* présente deux bases génétiques : les Bourbon et les Typica. Les pieds Bourbon tirent leur nom de l'île Bourbon ou île de La Réunion. Ils sont appelés *C. arabica* var. 'Bourbon'. Cette variété possède un mutant naturel appelé *C. arabica* var. 'Bourbon pointu', Leroy ou Laurina (du nom de la mutation spontanée dont elle provient). La mutation est monogénique et récessive, donc très proche génétiquement de Bourbon (v. Chapitre I, partie II.5). Parmi ses caractéristiques, il est pauvre en caféine par rapport à Bourbon (0.7% contre 1.2%). Le Bourbon pointu possède des caractéristiques organoleptiques particulières qui en font un café d'exception.

La caractérisation des effets de la mutation *laurina* sur le développement des fruits et des plantules, et les conséquences de ses effets sur la composition en polysaccharides pariétaux constitue la problématique générale de la thèse.

Ce manuscrit est construit autour de quatre grands chapitres.

1/ Le chapitre I est une synthèse bibliographique partagée en quatre parties.

- Dans la première partie, les caféiers sont décrits botaniquement puis suivant leur classification. Ensuite l'histoire de la culture de *C. arabica* est abordée et enfin la mutation *laurina* est présentée.

- La seconde partie s'articule autour du développement du fruit et de la graine, puis de la plantule.

- La partie suivante traite des parois végétales en général. Elle fait un état des connaissances sur les polysaccharides pariétaux qui sont retrouvés chez les caféiers

- Ensuite deux composés importants chez le caféier sont présentés à la fois chez les plantules et les fructifications : la caféine et l'acide chlorogénique ainsi que le complexe qu'ils forment ensemble (le chlorogénate de caféine).

2/ Dans le chapitre II l'impact de la mutation sur les graines et fruits est étudié au cours de leur développement. Trois volets sont développés :

- Dans un premier temps, du fait qu'aucune étude scientifique n'avait encore été réalisée pour caractériser l'effet de la mutation sur le fruit et la graine, nous avons comparé le développement des fruits et graines des deux variétés Bourbon et Bourbon pointu d'un point de vue histologique et morphologique. Le travail réalisé permet donc d'avoir une meilleure connaissance morphologique des graines et fruits chez un mutant d'intérêt agronomique.

- Dans un second temps, la littérature montrant la présence de la caféine dans la paroi (v. synthèse bibliographique), nous avons émis l'hypothèse que la composition pariétale pouvait avoir un rôle. Dans un premier temps, des observations au microscope multiphoton sur des graines matures nous ont permis de vérifier que la caféine et l'acide chlorogénique étaient stockés dans les parois chez la graine mature. Nous avons donc comparé de nouveau les variétés B et BP afin d'y mettre en évidence des effets de la mutation sur la composition en polysaccharides au cours du développement de la graine.

- La mutation affecte les teneurs de certains composés biochimiques comme la caféine (v. Chapitre I, partie II.5b). En revanche, aucun travail n'avait étudié l'accumulation de la caféine chez Bourbon pointu au cours du développement du fruit. Nous avons donc étudié les

profils d'accumulation de la caféine et des acides chlorogéniques au cours du développement des graines.

3/ Le chapitre trois concerne l'étude du développement des plantules de Bourbon et de Bourbon pointu. La mutation s'exprime sur les individus adultes sous forme d'effets pléiotropiques (v. Chapitre I, partie II.5.a). Il était donc intéressant de déterminer si elle était effective de façon précoce, et sur quelles parties –cotylédons, hypocotyle et racines - de ladite plantule. Afin de mettre en évidence de nouveaux effets pléiotropiques de la mutation, nous avons travaillé sur des plantules ayant germé et poussé avec ou sans lumière. Deux parties ont été développées :

- Tout d'abord, l'étude s'est portée sur les différences histo-morphologiques des plantules entières. Puis, afin de caractériser au mieux la mutation, nous avons étudié les différences putatives de croissance entre les hypocotyles de Bourbon et Bourbon pointu, et enfin l'éventuel impact de la mutation sur les phytohormones.

- Par la suite, la caractérisation des effets de la mutation *laurina* a été réalisée sur la composition en mono et polysaccharides pariétaux pour chacune des parties de la plantule. En parallèle, le pattern de distribution de la caféine et de l'acide chlorogénique a été étudié. La mutation ayant un effet sur la teneur en caféine dans les graines, la première question a été de savoir ce qu'il en était chez la plantule (en supposant un possible effet maternel). D'autre part, la caféine n'est pas répartie uniformément dans les plantules de caféier : les cotylédons en sont riches, dans les racines elle est absente et l'hypocotyle a une teneur intermédiaire (El Hamidi & Wanner, 1964 ; Aerts & Baumann, 1994 ; Zheng & Ashihara, 2004). Qu'en est-il pour le mutant Bourbon pointu qui est pauvre en caféine ? Si ce différentiel d'accumulation entre les parties de la plantule se vérifie, la caféine étant capable de traverser les membranes, ceci suggère son piégeage au niveau des cotylédons. La plantule devient ainsi un modèle pour rechercher l'origine de ce piégeage dans la composition des parois et en comparant ainsi les cotylédons aux racines et à l'hypocotyle

4/ Dans le quatrième chapitre, la conclusion générale ainsi que la présentation des perspectives de ces travaux sont abordées.

# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## I. Les caféiers

Parmi la centaine d'espèces de caféiers répertoriées, seulement deux espèces produisent 99% du café consommé dans le monde : *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* Pierre. Ces deux espèces représentent respectivement 65 % et 35 % de la production mondiale, d'après l'organisation internationale du Café (ICO, <http://www.ico.org/>). D'autres espèces comme *C. liberica* Bull. ex Hiern et *C. congensis* A. Frohner et leurs hybrides Congusta sont aussi cultivées, mais leur production est résiduelle au regard des deux espèces précédemment citées. Le Brésil est le plus gros producteur de café Arabica, tandis que *C. canephora* est surtout cultivé au Vietnam, au Brésil et en Indonésie (<http://www.thecoffeeguide.org/>).

### I.1 Classification générale

Les caféiers sont des arbres ou arbustes endémiques des forêts intertropicales. Ils appartiennent à la famille des Rubiacées et à la tribu des *Coffeae*.

Sur la base des caractéristiques florales, la tribu des *Coffeae* a été scindée en deux genres : *Coffea* L. et *Psilanthus* Hook.f (Bridson, 1986 ; Bridson & Verdcourt, 1988). Le genre *Coffea* L., défini par Linné en 1753, est caractérisé par ses graines à placentation « cofféenne » (Leroy, 1980). Depuis lors, de nombreux remaniements ont été apportés sur la classification taxonomique des caféiers. Les fleurs des espèces du genre *Coffea*, défini alors, ont des anthères et des stigmates externes ainsi qu'un long style. En revanche, dans le genre *Psilanthus*, les fleurs ont des anthères et des stigmates inclus dans le tube de la corolle qui entourent un style court. Chacun de ces deux genres a été alors subdivisé en sous-genres. Le genre *Coffea* comprend alors le sous-genre *Coffea* (présent en Afrique de la Guinée à la Tanzanie et de l'Ethiopie au Mozambique, à Madagascar, aux Comores et dans les Iles des Mascareignes) et le sous-genre *Baracoffea* Leroy (présent uniquement dans l'ouest de Madagascar) (Davis et al., 2005; Leroy, 1961) ; le genre *Psilanthus* qui regroupe les sous-genres *Psilanthus* et *Afrocoffea* P. Moens est composé de 20 espèces réparties d'Afrique de l'Ouest au Nord de l'Australie (Davis, 2003; Govaerts et al., 2011). Des travaux récents, basés sur l'étude de séquences d'ADN nucléaire et plastidique, ont permis de regrouper les deux sous-genres *Coffea* et *Baracoffea* dans le genre *Coffea* (Maurin et al., 2007). Enfin, concernant la tribu *Coffeae*, des travaux encore plus récents ont montré que la division en

genres *Coffea* et *Psilanthus* était obsolète (Davis et al. 2011), ces deux genres étant désormais regroupés sous le genre *Coffea*. Cette nouvelle classification permet d'y inclure un total de 124 espèces et d'étendre la distribution géographique à l'Asie et à l'Australie.

Dans la suite de la thèse, nous nous en tiendrons à l'ancien sous-genre *Coffea* tel que défini par Leroy/Bridson.

## **I.2 Principales caractéristiques génétiques des caféiers**

### **I.2.a Structure du génome**

Les espèces appartenant au genre *Coffea* sont toutes diploïdes ( $2n = 2x = 22$ ) (Sybenga, 1960 ; Charrier, 1976 ; Louarn, 1992) à l'exception de *C. arabica* qui est amphidiploïde ( $2n = 4x = 44$ ) (Carvalho & Krug, 1950 ; Bouharmont, 1959 ; Leroy & Plu, 1966 ; Grassias & Kammacher, 1975 ; Louarn, 1972). Ce dernier serait issu de l'hybridation entre *C. canephora* (parent mâle) et *C. eugenoides* Moore (parent femelle) ou des écotypes proches (Lashermes et al., 1999).

Les onze chromosomes du génome de base sont de petite taille (Bouharmont, 1963). La quantité d'ADN nucléaire chez les espèces diploïdes est comprise entre 1.04 (*C. racemosa* Lour.) et 1.76 pg (*C. humilis* Chev.) (Noirot et al., 2003). Chez *C. arabica*, qui est tétraploïde, elle peut atteindre 2.61 pg (Cros et al., 1995) avec un nombre de bases d'environ 950Mb (Anthony & Lashermes, 2005).

### **I.2.b Mode de reproduction et barrières reproductives**

L'allogamie est le mode de reproduction majeur chez les caféiers (Charrier 1976), l'autogamie préférentielle n'existant que chez *C. arabica*, *C. heterocalyx* Stoff. et *C. anthonii* Stoff. & Anth. (Coulibaly et al., 2002 ; Stoffelen et al., 2009). L'allogamie résulte d'une auto-incompatibilité de type gamétophytique, contrôlée par un seul locus avec plusieurs allèles (Berthaud, 1986). Le gène a été génétiquement cartographié lors d'un croisement entre l'espèce allogame *C. canephora* et l'espèce autogame *C. heterocalyx* (Coulibaly et al., 2002).

Les barrières à l'hybridation interspécifique sont les barrières pré-zygotiques et les barrières post-zygotiques. Il existe de nombreux mécanismes qui interviennent avant la fécondation et qui empêchent la formation des hybrides. Parmi ceux-ci, la barrière spatio-temporelle en est une. Elle concerne les espèces éloignées géographiquement ou qui présentent des floraisons

décalées dans le temps. Concernant les barrières post-zygotiques, elles interviennent après la fécondation et peuvent agir sur les premières divisions du zygote, le développement de l'embryon, la germination, la croissance et la reproduction (Stebbins, 1958). Chez les caféiers, la date de floraison est variable (cf I.3.) et constitue dans la nature une barrière pré-zygotique importante. La vigueur et la fertilité des hybrides interspécifiques appartiennent aux barrières post-zygotiques. La fertilité des hybrides est liée à la présence de chromosomes univalents lors de la métaphase I de la méiose (Louarn 1992). Elle constitue en amélioration génétique du caféier un obstacle majeur pour le transfert de gènes d'intérêt.

### I.2.c Phylogénie des caféiers

A partir de l'ADN ribosomal nucléaire, Lashermes et al. (1997) ont identifié quatre clades majeurs avec une forte correspondance géographique. Le premier inclut toutes les espèces présentes à Madagascar (anciennement *Mascarocoffea* d'après Chevalier 1947). Le second clade est composé d'espèces endémiques de la région située dans la « Rift Valley » : entre le rift de Kivu et le canal du Mozambique (anciennement *Mozambicoffea* d'après Chevalier 1947). Le troisième clade comprend des espèces observées entre le Cameroun et le Kenya. Il est composé de *C. eugenioides*, *C. anthonii* et *C. heterocalyx* (ces deux dernières espèces diploïdes étant les seules connues comme auto-fertiles). Le dernier clade contient des espèces diploïdes majoritairement présentes en Afrique de l'Ouest ou Centrale, dont les plus connues pour leur mise en culture sont *C. canephora*, *C. liberica* et *C. congensis*.

A partir d'ADN chloroplastique, qui révèle la filiation maternelle, Cros et al. (1998) ont mis en évidence cinq clades, corrélés aussi aux zones géographiques. Les espèces issues de la zone guinéo-congolaise se classent dans deux clades. Le premier est composé des espèces *C. stenophylla* Don et *C. humilis* qui occupent la Côte d'Ivoire jusqu'à la frontière Guinéenne. Le second renferme les espèces *C. canephora*, *C. congensis*, *C. brevipes* Hiern, *C. liberica*, *C. heterocalyx*, et *C. kapakata* Bridson ex-Chev.. Le clade suivant comprend *C. eugenioides* et *C. anthonii*. Le quatrième clade regroupe des espèces strictement endémiques de Madagascar et des îles des Mascareignes comme *C. bertrandii* Chev., *C. humblotiana* Baill. et *C. millotii* Leroy. Enfin, le dernier clade inclut les espèces d'Afrique de l'Est comme *C. racemosa*, *C. salvatrix* Swynn & Phillipson, *C. pseudozanguebariae* Bridson, *C. sessiliflora* Bridson.

Dans l'ensemble, les deux types d'ADN conduisent à de fortes ressemblances des groupes, les différences ne concernant que quelques espèces comme *C. heterocalyx*, *C. stenophylla* et *C.*

*humilis*. Enfin, l'espèce tétraploïde *C. arabica* a aussi été introduite dans les deux types d'analyses. Elle est proche de *C. eugenoides* lorsqu'il est tenu compte de l'ADN chloroplastique, ce qui correspond à sa putative origine maternelle, et de *C. canephora* lorsque l'analyse est effectuée à partir de l'ADN ribosomique.

D'autres travaux sur la phylogénie des caféiers ont été réalisés ultérieurement avec pour objectif d'y intégrer d'autres espèces, sous-genres et genres (Davis et al., 2011; Maurin et al., 2007).

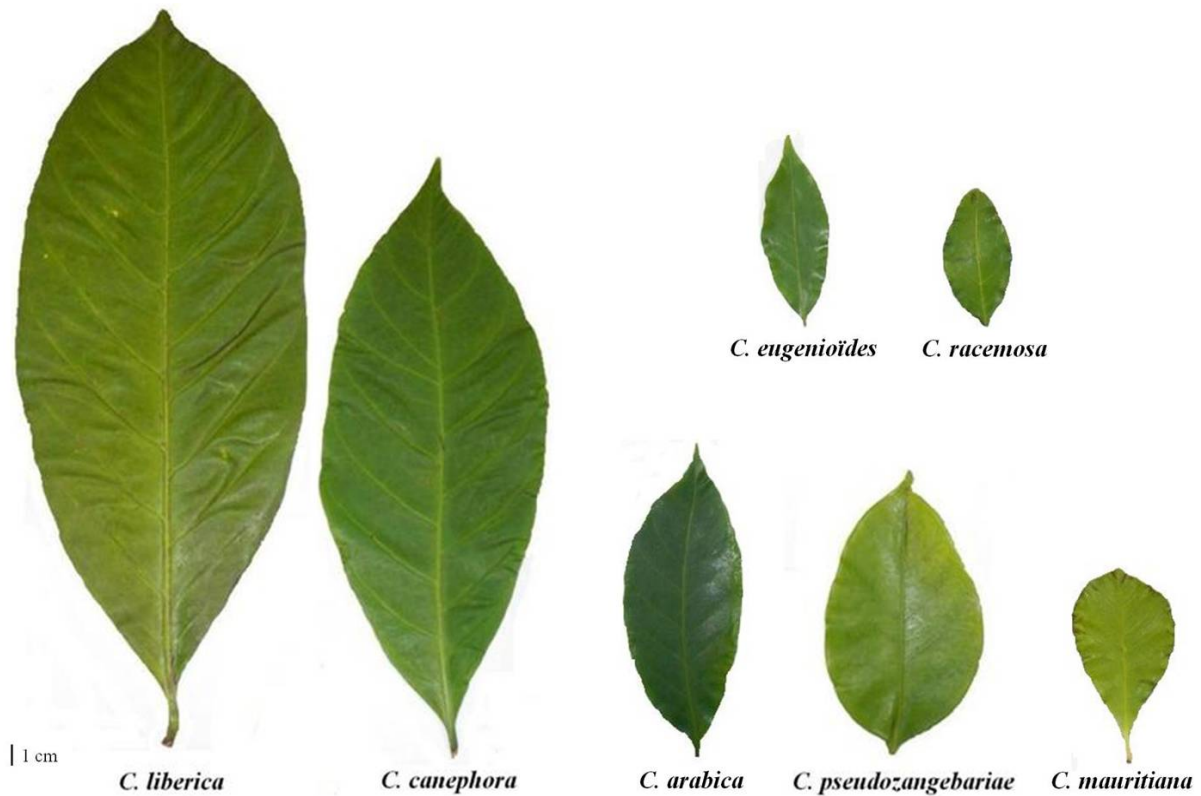
### I.3 Diversité des caféiers

#### I.3.a Morphologique

Les caféiers sont des arbres ou des arbustes dont la hauteur varie de 1 à 2 mètres pour les espèces comme *C. humilis* et *C. heterocalyx*, jusqu'à 18 mètres pour les plus grandes comme *C. liberica* (Clifford et al., 1985). Ils ont une architecture suivant le modèle de Roux c'est-à-dire que le tronc est monopodial, orthotrope et régulièrement ramifié de deux rameaux plagiotropes opposés sur chaque nœud du tronc (Hallé & Oldeman, 1970). Ces rameaux latéraux sont les branches florifères et peuvent se ramifier en un 2<sup>ème</sup> voire 3<sup>ème</sup> axe plagiotrope. Leurs feuilles sont persistantes (sauf pour *C. racemosa*) simples et opposées, et ont une grande diversité de forme et de taille selon les espèces (Fig. 1).

Les inflorescences apparaissent à l'aisselle des feuilles des axes plagiotropes, sauf chez *C. macrocarpa* Rich. où elles sont localisées à la base des feuilles de l'axe orthotrope et chez certaines espèces de Madagascar où elles peuvent être aussi terminales. Elles peuvent aussi émerger à partir d'anciennes cicatrices foliaires comme dans la série des *Verae* (Charrier 1976). Les inflorescences sont uniflores chez certaines espèces comme par exemple *C. mauritiana* Lam., mais dans la grande majorité des cas elles forment une cyme pluriflore. Le nombre d'inflorescences par nœud et le nombre de fleurs par inflorescences montrent une grande diversité intraspécifique opposant, en Afrique, des espèces comme *C. pseudozanguebariae* avec 4,5 fleurs par nœud en moyenne à *C. canephora* montrant de véritables coussinets floraux (36 fleurs par nœud en moyenne) (Akaffou et al., 2014). Cette diversité est à associer avec l'importance relative des pollinisations anémophile et entomophile propre à chaque espèce.

Les fleurs sont tubuleuses et de couleur blanche, voire légèrement rosée dans certains cas lorsqu'elles se fanent (Fig. 2). Leur taille et le nombre de lobes (de 5 à 8) varient aussi entre espèces.



**Figure 1 : Feuilles de différentes espèces de caféiers (Photos : S. Adler)**



**Figure 2 : Fleurs de différentes espèces de caféiers (Photos : S. Adler)**

Le fruit du caféier, appelé aussi drupe ou cerise, est un faux fruit. Il est en effet formé de la composition de plusieurs organes de la fleur (principalement le réceptacle floral). Ceci est à



opposer au vrai fruit où seul le pistil se transforme après la fécondation tandis que les autres parties de la fleur dégénèrent. Comme les pommes et les poires (ou drupes complexes), le péricarpe est le réceptacle floral et à l'opposé du pédoncule, il y a une petite cavité qui contient les restes des pièces florales (sépales, étamines desséchées). Ces restes sont visibles chez des caféiers comme *C. heterocalyx*, voire chez certains génotypes de *C. arabica*. Le fruit est composé d'un exocarpe (ou épicarpe) changeant de couleur à maturité, d'un mésocarpe charnu et de deux graines accolées par leur face plane à invagination « cofféenne » et entourées d'un tégument fibreux appelé parche (Chevalier, 1947; Leroy, 1980). Une grande variété de formes, de tailles et de couleurs (vert, jaune, orange, rouge, violet, noir, blanc) (Fig. 3) est répertoriée chez les différentes espèces. Les fruits rouges à maturité sont connus pour attirer les animaux diurnes comme les singes qui assurent alors la dispersion des graines (Gautier-Hion et al., 1985). En revanche les fruits bleus à maturité verraient leur dispersion assurée par des animaux nocturnes comme les roussettes (Fleming & Heithaus, 1981).



**Figure 3 : Fruits de caféiers illustrant la diversité de forme et de couleur du péricarpe. De gauche à droite : *C. kapakata*, *C. arabica*, *C. pocsii* Bridson, *C. canephora* (Photos : S. Adler & O. Lavogez)**

### **I.3.b Phénologique**

Les bourgeons floraux apparaissent après une certaine durée de sécheresse propre à chaque espèce (Portères, 1946) et restent ensuite dormants jusqu'à la floraison. Cette dernière est provoquée par le dépassement d'un seuil de pluviométrie, atteint, en général, pendant la saison des pluies. La floraison a lieu de 4 (*C. vatovayensis* J.-F. Leroy) à 14 jours (*C. richardii* J.-F. Leroy) après la pluie déclencheuse et dure de 24h à 48h selon les espèces, l'intensité de la pluie et la température (Alvim, 1973; Charrier, 1976).

Chez les caféiers, l'ovaire est généralement biloculé et chaque loge contient un seul ovule anatrope. Il arrive cependant des cas de polyspermie. De même, des ovaires triloculés sont présents chez certaines espèces comme *C. heterocalyx* et *C. arabica* (Chevalier, 1947 ;

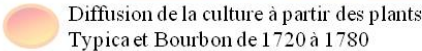
Dedecca, 1957 ; Mendes, 1941 ; Vishveshwara & Chinnappa, 1965). La fécondation des deux ovules conduit à des fruits contenant deux graines. Néanmoins, il existe des fruits à une seule graine (caracoli) dont l'origine est expliquée par un défaut de pollinisation ou un avortement post-zygotique précoce (De Reffye, 1974). Il arrive aussi que l'intérieur de la graine, délimitée par la parche, soit vide. De telles graines sont appelées loges vides et issues de l'avortement tardif de l'albumen (De Reffye, 1974).

La durée de la fructification montre aussi une grande diversité interspécifique. Elle varie en effet de 10 semaines (*C. pseudozanguebariae*) à 13 mois (*C. canephora*) et est gouvernée par un gène majeur (Charrier, 1972 ; Anthony, 1992 ; Dussert et al., 2000 ; Akaffou et al., 2003 ; Akaffou et al., 2014).

#### **I.4 *Coffea arabica***

*C. arabica* est principalement autogame, mais le taux résiduel d'allopollinisation varie de 5 à 20% selon les génotypes avec une moyenne de 10% (Carvalho & Krug, 1949 ; Charrier, 1978 ; Monaco & Carvalho, 1963).

*C. arabica* est natif des régions montagneuses du Sud-Ouest de l'Éthiopie (Sylvain, 1955), du plateau Boma au Sud-Est du Soudan (Thomas, 1942) et du mont Marsabit du Kenya (Anthony et al., 1987). *C. arabica* a été cultivé au Yémen pendant au moins 5 siècles avant d'être diffusé à travers le monde. La première introduction hors de la péninsule Arabique est due aux Hollandais qui l'ont introduit à Java en Indonésie (Carvalho, 1946). Cette introduction est à l'origine de la variété Typica. En 1710, un seul de ces plants a été introduit dans le jardin botanique d'Amsterdam et en 1714, un plant fut offert à la France et planté avec succès dans la serre du Jardin du Roi. C'est en 1718 que les descendants ont été amenés en Amérique Latine avant d'être propagés dans les Antilles (1720 ou 1723) (De Candolle, 1883 ; Chevalier & Dagron, 1928 ; Carvalho, 1946 ; Krug & Carvalho, 1946). En 1715, une seconde introduction a eu lieu à partir du Yémen vers l'Île Bourbon et est à l'origine de la variété du même nom. Comme pour Typica, cette variété a ensuite été introduite au Brésil (Haarer, 1956 ; Berthaud & Charrier, 1988 ; Anthony et al., 2002) (Fig. 4).



#### Figure 4 : Les grandes étapes de l'histoire de la Caféculture

De nos jours, la quasi-totalité des plants cultivés de *C. arabica* est issue de ces deux variétés. En raison, du nombre très faible d'individus à l'origine des caféiers en plantation à travers le monde, ainsi que du mode de reproduction de *C. arabica*, les variétés cultivées présentent une très faible diversité génétique (Anthony et al., 2002).

Les mutants naturels de *C. arabica* sont relativement fréquents. Leur mise en évidence a été facilitée par l'autogamie préférentielle qui permet l'émergence des génotypes homozygotes. Parmi ces mutants naturels, certains se sont révélés intéressants d'un point de vue agronomique et ont été cultivés ou exploités à des fins de croisement. C'est le cas, par exemple, des mutants Caturra (forme compacte du Bourbon), Maragogype (mutant de Typica) et des cultivars Blue Mountain, Mundo Novo (croisement de Typica et Bourbon) ou encore Catuai (hybride de Mundo Novo et de Caturra) (Krug, 1949 ; Krug & Carvalho, 1951).

## I.5 Mutation *laurina*

*Coffea arabica* ‘Laurina’ est plus connu sous le nom de variété Leroy, Laurina ou Bourbon Pointu. C’est en 1822 que Billard a décrit pour la première fois la variété apparue à La Réunion. Les variétés Bourbon et Bourbon Pointu seront notées respectivement B et BP dans le reste du manuscrit.

Quatre hypothèses ont été émises concernant l'origine de BP et leur confrontation a été synthétisée par Lécotier et al. (2009b).

- D'après la première hypothèse, BP serait issu d'une hybridation interspécifique entre *C. arabica* 'Bourbon' et *Coffea mauritiana*, espèce endémique des Mascareignes (De Villèle, 1920; Raoul, 1897). L'extrémité pointue de la graine, commune à BP et *C. mauritiana*, et la teneur en caféine de BP intermédiaire entre *C. arabica* et *C. mauritiana* sont à l'origine de cette hypothèse. Néanmoins, un croisement entre une espèce tétraploïde (*C. arabica*) et une espèce de caféier diploïde donne une majorité d'hybrides triploïdes, fortement stériles (1 à 2% de fertilité). De plus, les descendance d'un tel hybride seraient loin d'être homogène. Dans notre cas, BP est tétraploïde, entièrement fertile, génétiquement très proche de *C. arabica* et plus particulièrement de B, et donne une descendance très homogène. Cette hypothèse doit être rejetée.

- Selon la seconde hypothèse, BP aurait été introduit sur l'île de La Réunion par l'homme à partir de l'Afrique. Si cette hypothèse est vraie, une différenciation génétique est attendue entre B et BP et doit être du même ordre de grandeur que celle existant entre 'Typica' et 'Bourbon'. Or, la distance génétique de Nei's est de 0,187 entre 'Typica' et 'Bourbon' (Anthony et al., 2001) et de 0,0005 entre B et BP (Lécotier et al., 2009b). Ainsi l'hypothèse d'une introduction sur La Réunion à partir de l'Afrique est écartée.

- La troisième hypothèse, récemment formulée, dit que BP est un caféier endémique de La Réunion. Le même argumentaire que pour une introduction à partir d'Afrique peut être appliqué à l'origine endémique. En effet, deux introductions indépendantes devraient aboutir à une plus grande distance génétique que celle observée. De plus, BP devrait être autant présent que *C. mauritiana* dans la forêt originelle de l'île. Ce n'est pas le cas et l'hypothèse est invalidée.

- Enfin la dernière hypothèse repose sur l'origine mutationnelle de BP. Elle a été renforcée par l'apparition chez *C. arabica* d'autres mutations comme *angustifolia*, *crespa*, *erecta*, *semperflorens*. Les hybrides F1 entre B et BP sont de type *Lrlr* et présentent un phénotype B. Donc *Lr* est l'allèle dominant et *lr* le récessif (Krug et al., 1954). La génération F2 présente une ségrégation 3:1. D'autre part, le rétrocroisement F1 avec B donne 100% de descendants B et avec BP produit 50% de B et 50% de BP. Ces résultats sont caractéristiques d'une mutation monogénique, récessive et Mendélienne (Krug et al., 1954). La mutation

affecte le phénotype sur plusieurs niveaux (forme de l'arbre, des graines, semi-nanisme...) et est appelée pléiotropique. D'autre part, il existe des réversions de la mutation avec retour à la morphologie B sur un pied de BP. Ces résultats suggèrent une origine épigénétique due par exemple à de la méthylation ou des transposons (Martienssen, 1996). Cette hypothèse est la plus probable.

BP a été découvert pour sa résistance à la sécheresse et multiplié dans des champs de l'île Bourbon au début du 19<sup>ème</sup> siècle (Chevalier, 1947; De Villèle, 1920; Raoul, 1897) avant qu'on en découvre les caractéristiques organoleptiques. Cette mutation a des effets pléiotropiques et affecte non seulement la morphologie de l'arbre mais aussi la composition biochimique de la graine.

### **I.5.a Caractéristiques phénotypiques**

BP est une variété dite semi-naine. Le nanisme est dû à des entrenœuds plus petits. Au niveau cellulaire, ce nanisme est expliqué par des cellules moins nombreuses et plus petites (Lécolier et al., 2009c). Le nanisme des entrenœuds est plus prononcé sur les branches que sur le tronc, d'où le port dit en sapin de Noël (Fig. 5) (Lécolier et al., 2009a). Les effets de la mutation sur le méristème caulinaire consistent en une réduction de la taille des primordia, ce qui a comme conséquence le nanisme des feuilles matures. Cependant, la mutation n'a aucun effet sur la relation entre le phyllochrone et le plastochrone, c'est-à-dire la phyllotaxie décussée et opposée, et le temps de développement du méristème caulinaire dans le plastochrone (Lécolier et al., 2009a).



**Figure 5 : *C. arabica* BP (Photo. Coopérative Bourbon Pointu)**

### **I.5.b Caractéristiques biochimiques**

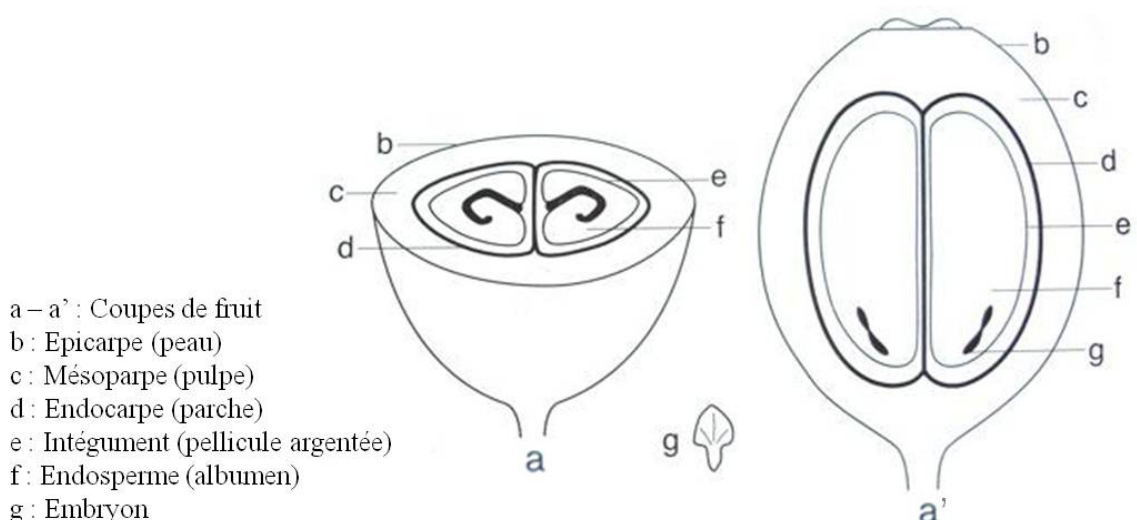
Chez BP, les études biochimiques disponibles concernent principalement la graine à maturité. Différents composés ont été analysés comme la caféine (entre 0,6 et 0,75% de la MS) (Charrier & Berthaud, 1975 ; Clifford et al., 1989 ; Baumann et al., 1998), les acides chlorogéniques (environ 7% de la MS) (Clifford et al., 1989 ; Joët et al., 2010), quelques sucres (le saccharose, le glucose et le fructose représentent respectivement 7,08, 0,04 et 0,03% de la MS) (Joët et al., 2010 ; Piccino, 2011), la trigonelline (1,36% de la MS) (Piccino, 2011) et les lipides (Joët, et al., 2010 ; Piccino, 2011).

## **II. Le développement histologique et morphologique du fruit, de la graine et de la plantule**

### **II.1 Fruit & Graine**

Le fruit comprend le péricarpe et la graine (Fig. 6).





**Figure 6 : Coupe a) transversale et a') longitudinale de fruit de caféier (Source : [http://www.sweetmarias.com/defects\\_seedstructure/defects\\_seedstructure.html](http://www.sweetmarias.com/defects_seedstructure/defects_seedstructure.html))**

Le péricarpe est composé d'un exocarpe (ou épicarpe), un mésocarpe et un endocarpe. Cette organisation de tissus apparaît très tôt dans le développement du fruit (taille du fruit d'environ 2mm) et est conservée jusqu'à maturité (De Toledo, 1961). L'exocarpe, la partie la plus externe du fruit, est constitué d'une seule couche de cellules quadrangulaires (Chevalier, 1947). Le mésocarpe, appelé aussi pulpe, est riche en sucres et en eau. Il peut être divisé en trois zones distinctes : la plus externe est du tissu parenchymatique avec des cellules rondes aux parois épaisses, puis vient une région avec des cellules aux parois fines de formes polygonales et enfin, la plus interne est l'endocarpe (Chevalier, 1947 ; Mendes, 1942). Le devenir de cette dernière zone est sujet à controverse. En effet, certains auteurs considèrent que ce tissu est composé d'une seule couche de cellules quadrangulaires qui disparaît dans les fruits matures (Chevalier, 1947) ; pour d'autres l'endocarpe est constitué de plusieurs couches de cellules et devient ensuite la parche (De Castro & Marraccini, 2006 ; De Toledo, 1961 ; Dedecca, 1957 ; Mendes, 1941 ; Vishweswara & Chinnappa, 1965).

Dans la graine, le périsperme (le tissu maternel) se développe à partir du nucelle de l'ovule juste après la fécondation (Mendes, 1942) et remplit la loge pendant la croissance du fruit. Cinq à six semaines après la floraison les premières divisions de l'endosperme apparaissent et il devient visible au moins à partir de 12 semaines après floraison (SAF) (Vishveshwara & Chinnappa, 1965). A partir de là, l'endosperme, qui est un tissu triploïde d'origine non-sporophytique (Mendes, 1941 ; Medina, 1964, 1965 ; De Castro et al., 2001), se développe et remplace progressivement le périsperme. A la fin de la croissance, l'endosperme occupe la

totalité de la loge et le péricarpe forme une fine pellicule argentée de 70µm entourant l'albumen (De Castro et al., 2001 ; Dedecca, 1957 ; Mendes, 1941).

Le développement des fruits et graines de *C. arabica* a été bien décrit dans la littérature (Cannel, 1974 ; De Castro et al., 2004 ; Keller et al., 1972 ; Leon & Fournier, 1962 ; Ramaiah & Vasudeva, 1969 ; Salmona et al., 2008 ; Srinivasan et al., 1978 ; Wormer, 1964). Deux grands types de descriptions ont été abordés : l'aspect qualitatif et l'aspect quantitatif. La description qualitative caractérise les différentes phases du développement (croissance et maturation) grâce à des caractéristiques morphologiques : consistance de la graine (aqueuse, laiteuse, dure), taille du fruit (petit, pleine croissance, mûrissement) et couleur du fruit (vert, jaune, rouge) (De Castro & Marraccini, 2006 ; Salmona et al., 2008). L'aspect quantitatif, quant à lui, permet de décrire l'évolution, dans une dimension temporelle (en nombre de jours ou de semaines après la floraison), du poids frais ou sec du fruit (Cannel, 1974 ; De Castro et al., 2004 ; Ramaiah & Vasudeva, 1969 ; Srinivasan et al., 1978 ; Wormer, 1964), de la longueur et la largeur du fruit (Leon & Fournier, 1962 ; Srinivasan et al., 1978). De Castro & Marraccini (2006) ont étudié l'évolution qualitative de la fructification en la divisant en trois phases clés : la phase maternelle avec la croissance du péricarpe, la phase de développement de l'endosperme pendant laquelle l'endosperme remplace progressivement le péricarpe, et enfin la phase de maturation du péricarpe avec le changement de couleur du fruit. Salmona et al. (2008) ont montré que ces trois phases pouvaient être divisées en sept stades de développement (Fig. 7). Aux stades 1 et 2 la graine est formée par un péricarpe aqueux. Le fruit pèse moins de 0,5g au stade 1 puis augmente en poids, caractérisant le stade 2 (plus de 0.5g). Vient ensuite le stade 3 pendant lequel l'endosperme aqueux remplace graduellement le péricarpe verdâtre et occupe toute la loge. Les lipides et les acides chlorogéniques (ACG) commencent à s'accumuler aussitôt que l'endosperme commence à se développer (Joët et al., 2009). Au stade 4, l'endosperme devient laiteux de par l'accumulation des lipides, puis se durcit (stade 5). Par la suite, les stades 6 et 7 correspondent à la maturation du péricarpe avec coloration de l'épicarpe en jaune (stade 6) puis en rouge (stade 7). Le stockage des lipides et de tous les sucres se termine pendant le stade 6. Quantitativement, l'augmentation du poids frais et sec du fruit provient de deux mécanismes qui sont à l'origine de deux phases distinctes : la 1<sup>ère</sup> (stades 1 à 4) expliquée par la croissance en taille et la 2<sup>nde</sup> (stades 5 à 7) par l'épaississement des parois cellulaires et l'accumulation de protéines et de lipides de stockage (Dentan, 1985). La croissance en taille (longueur et largeur) a, quant à elle, été caractérisée par une courbe sigmoïde (Leon & Fournier, 1962).



Du fait de la diversité des types de notation, nous nous baserons sur la notation de Salmona et al. (2008) sur l'ensemble de la synthèse bibliographique.

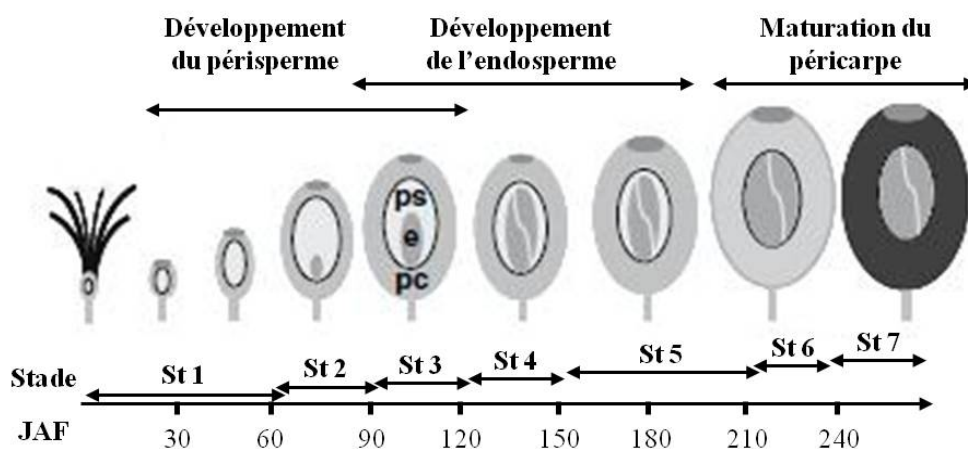


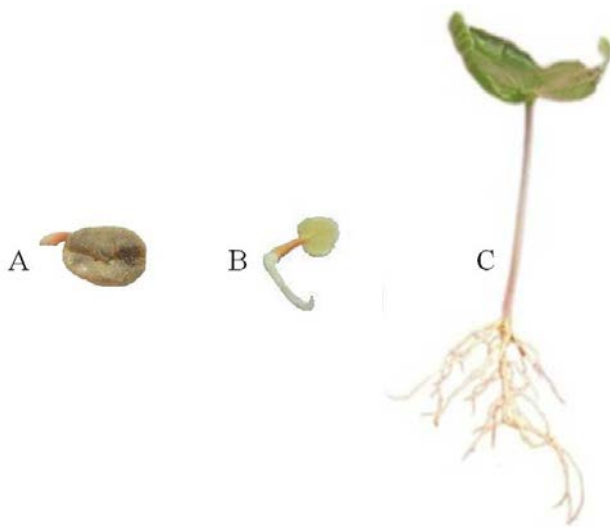
Figure 7 : Les changements de tissus durant le développement et la maturation de fruit de café. (D'après Salmona et al., 2008). e : endosperme ; ps : péricarpe ; pc : péricarpe, JAF : jour après floraison

## II.2 Plantule

La germination *sensu stricto* de la graine se termine quand la radicule émerge. Sa protrusion commence entre 5 et 6 jours après imbibition chez les graines de *C. arabica* en conditions optimales (graines sans parche, imbibition pendant 48h, croissance à obscurité, 30°C). Après dix jours, la protrusion de la radicule concerne 50% de la population. Quinze jours après imbibition, la germination est terminée pour la majorité des graines (Went, 1957 ; Maestri & Vieira, 1961 ; Valio, 1976, 1980 ; Da Silva et al., 2004). Enfin, il faut savoir que la présence de la parche inhibe fortement la germination (Valio, 1980).

En champ, la germination est définie comme étant l'émergence de la plantule hors du sol. La protrusion de la radicule est déjà finie quelques temps avant cette émergence. Les premières parties de la graine qui émergent du sol sont les cotylédons : la plantule a une croissance épigée. L'émergence des plantules de *C. arabica* commence entre 50 et 60 jours après semis pendant la saison la plus chaude de l'année (Maestri & Vieira, 1961). Quand les températures sont plus basses, la période d'émergence peut attendre les 90 jours après semis (Went, 1957). Après la sortie du sol, l'hypocotyle s'accroît fortement et les cotylédons se développent aux dépens de l'endosperme, tandis que la fonction chlorophyllienne s'installe (Wellman, 1961 ; Giorgini & Campos, 1992). Trois à quatre semaines sont nécessaires aux cotylédons pour digérer complètement l'endosperme et s'ouvrir (Huxley, 1964).

La morphologie de la graine de *C. arabica* après germination est présentée dans la figure 8.



**Figure 8 : A : Graine de B après germination (19 jours après semis), B : Plantule de B (20 jours après semis), C : Plantule de B (65 jours après semis) (Photo : S. Adler)**

La germination des graines de café est similaire chez les autres espèces de caféiers même si, pour certaines espèces où les graines sont plus petites, comme *C. racemosa*, la germination est plus rapide (en 10 jours ou moins) (Carelli & Monaco, 1977 ; Carvalho et al., 1991 ; Medina et al., 2011).

Valio (1976) et Da Silva et al. (2005) ont observé que, chez *C. arabica*, les graines sont sensibles à la lumière blanche, ce qui retarde leur germination. Elle stimule la biosynthèse d'acide gibbérellique (GA) dans la graine (Hilhorst & Karssen, 1992) qui devient supérieure à la teneur nécessaire pour la germination. Cet excès serait toxique, entraînant un retard dans la germination, voire l'inhibant (Da Silva et al., 2005).

### III. Structure des parois végétales: les sucres pariétaux

Selon les espèces végétales, l'âge et les tissus, la structure de la paroi cellulaire varie. Un modèle général peut être défini par des caractéristiques anatomiques. Ainsi, la paroi végétale peut être divisée en trois parties (Fig. 9) :

- La plus externe est la lamelle moyenne : c'est une couche qui sépare les cellules entre elles. Elle est riche en pectine et dépourvue de cellulose.

- La paroi primaire de type I (pour les plantes dicotylédones) : elle est composée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines. Elle est à la fois rigide même si elle est plus souple que la paroi secondaire, et elle assure une plasticité et une élasticité permettant la croissance et la division cellulaire.

- la paroi secondaire : elle est constituée d'un réseau de cellulose, d'hémicellulose et de lignine.

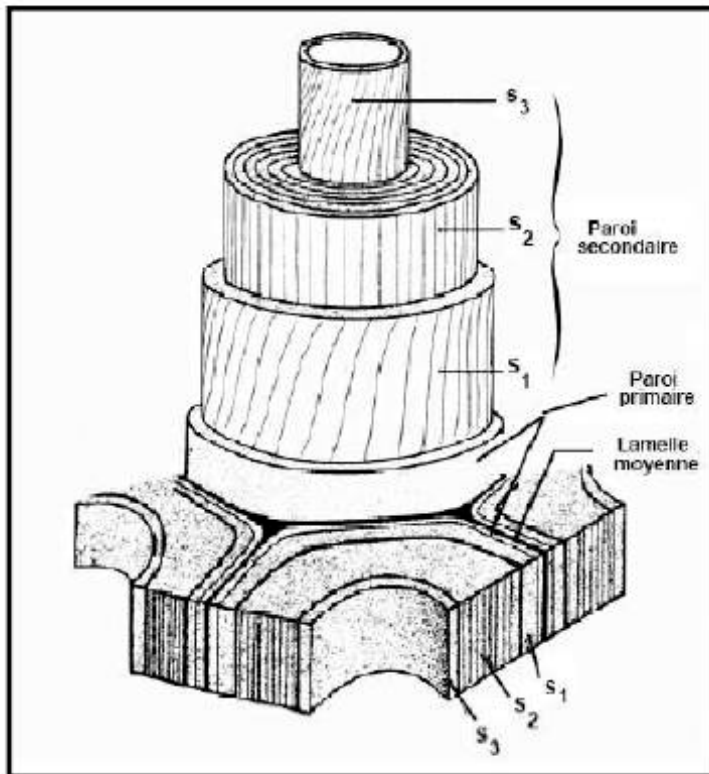


Figure 9 : Structure de la paroi végétale d'après Roland (1980). S1, S2 et S3 représentent les couches de la paroi secondaire et sont caractérisées par l'orientation des microfibrilles de cellulose.

### III.1 La paroi primaire

Au cours de ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement au cas de la paroi de type I qui est caractéristique des plantes dicotylédones et donc des caféiers. La paroi est principalement composée de polysaccharides. Ces polysaccharides appartiennent à différentes classes biochimiques : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Fig. 10).

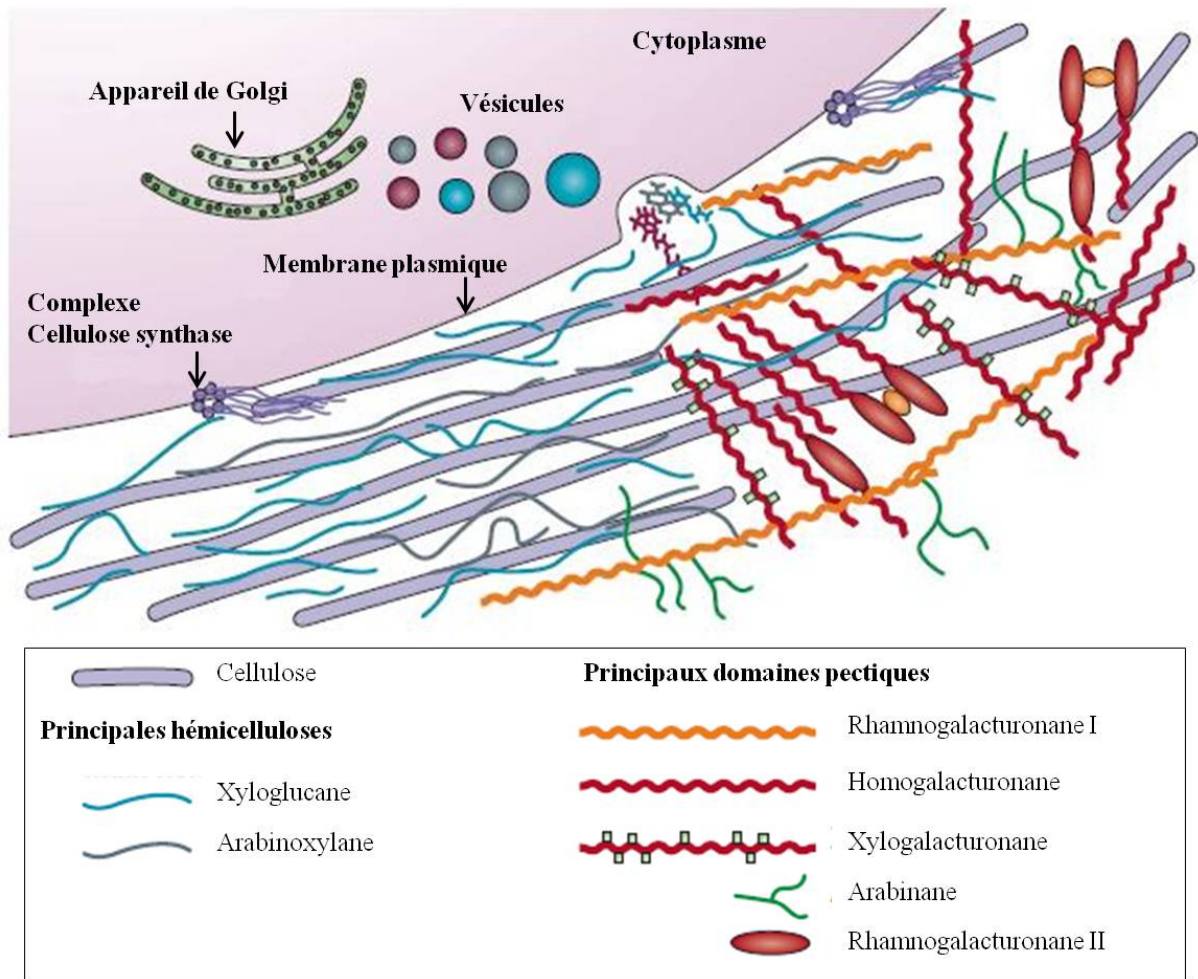


Figure 10 : La paroi primaire (Cosgrove, 2005)

### III.1.a Structure de la cellulose

La cellulose est un homopolymère linéaire composé de 500 à 1400 résidus de  $\beta$ -(1,4)-D-glucose (Somerville, 2006). L'association de nombreuses molécules de cellulose permet la formation de micro-fibrilles. Ces dernières s'assemblent entre elles sous forme de fibres et favorisent l'établissement d'un état solide ordonné, cristallin. Cette structure condensée confère une grande résistance chimique, enzymatique, mécanique et sa non solubilité dans l'eau (Cosgrove, 2005).

### III.1.b Structure des hémicelluloses

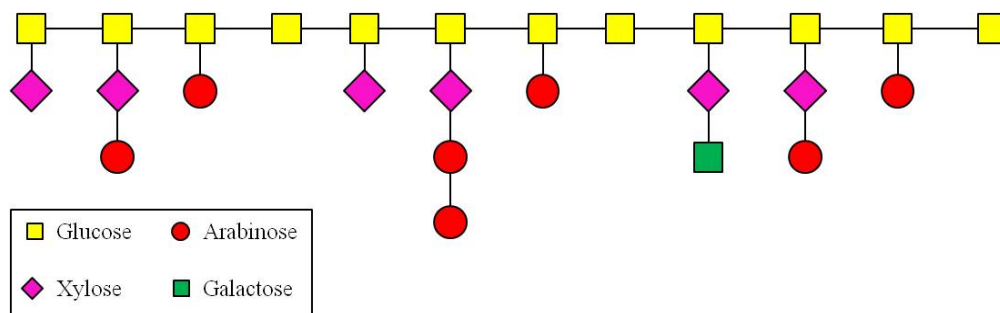
Les hémicelluloses représentent, après la cellulose, les polysaccharides les plus abondants dans la nature. Elles sont définies comme les polysaccharides de plantes qui sont solubilisées dans des solutions alcalines, mais pas dans l'eau, ni par des agents chélateurs (Selvendran et al., 1985). D'après cette définition, les xyloglucanes, glucomannanes, mannanes, xylanes,

arabinoxylanes et les arabinogalactanes sont considérés comme appartenant aux hémicelluloses. Cependant, O'Neill & York (2003) ont déterminé que les hémicelluloses étaient des polysaccharides pariétaux avec une structure homologue avec la cellulose, c'est-à-dire, composés d'une chaîne de résidus  $\beta$ -(1,4)-D-pyranose. De ce fait, les hémicelluloses comprennent les xyloglucanes, glucomannanes, mannanes, xylanes et arabinoxylanes, mais plus les arabinogalactanes. Nous garderons cette dernière définition pour l'ensemble des travaux.

Le squelette de base, qui est une association de résidus  $\beta$ -(1,4)-D-pyranose, peut être composé de glucose, mannose ou xylose. Ces hémicelluloses sont appelées respectivement, xyloglucanes, mannanes ou xylanes. La chaîne principale peut être constituée d'un seul type de monomère (homopolysaccharide) ou de plusieurs types différents (hétéropolysaccharide).

Deux des principales hémicelluloses sont le xyloglucane et l'arabinoxylane. Leur structure varie en fonction des plantes.

Le xyloglucane est composé d'un squelette de  $\beta$ -(1,4)-D-glucose où les glucoses peuvent être substitués par des résidus D-xyloses en  $\alpha$ -(1,6). Des résidus galactose et fucose peuvent être aussi liés au xylose (Fig. 11).



**Figure 11 : Structure d'un xyloglucane de *Solanaceae* (D'après : <http://www.crc.uga.edu/~mao/wallmab/Hemicel/hemi.htm>)**

L'arabinoxylane possède une chaîne principale composée d'un enchainement de  $\beta$ -(1,4)-D-xylose avec des branchements d'arabinose. De l'acide glucuronique et des esters d'acides féruliques peuvent aussi faire partie de l'arabinoxylane (Fig. 12).

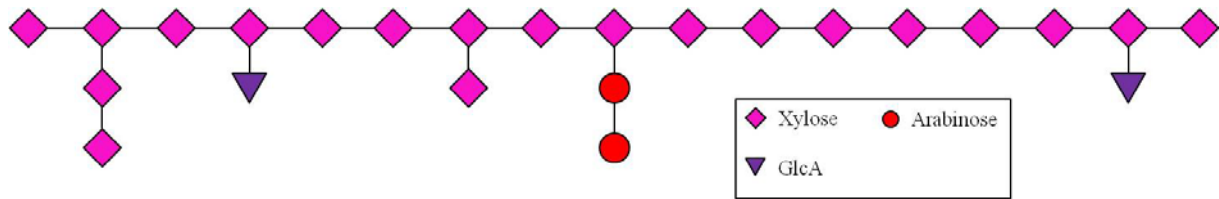


Figure 12 : Structure d'un xylane (Source : <http://www.ccruc.uga.edu/~mao/wallmab/Hemicel/hemi.htm>)

Les mannanes peuvent avoir deux types de chaînes : soit uniquement composée de  $\beta$ -(1,4)-D-mannose, soit une alternance de D-mannose et de D-glucose liés en  $\beta$ -(1,4) et sont appelés glucomannanes. Ces mannanes peuvent être substitués en  $\alpha$ -(1,6) par du D-galactose et donnent des galactomannanes ou des galactoglucomannanes (Fig. 13). Ils sont très abondants dans les graines où ils joueraient un rôle de réserve (Buckeridge et al., 2000 ; Hoch, 2007).

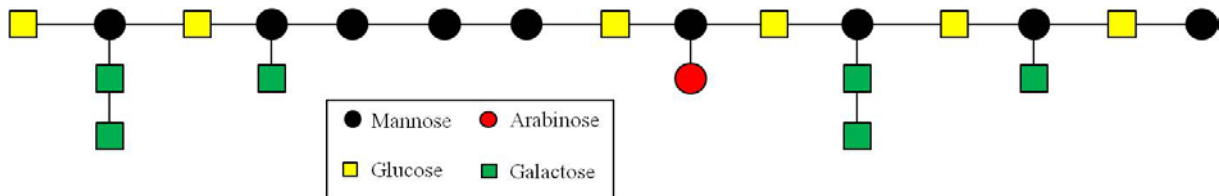


Figure 13 : Structure d'un galactoglucomannane (Source : <http://www.ccruc.uga.edu/~mao/wallmab/Hemicel/hemi.htm>)

### III.1.c Structure des pectines

C'est un groupe complexe et hétérogène de polysaccharides qui sont répartis suivant trois domaines. Ce sont : l'homogalacturonane (HG), le rhamnogalacturonane I (RG-1) et le rhamnogalacturonane II (RG-2). Ces domaines pourraient être liés ensemble de façon covalente (Ridley et al., 2001 ; Vincken et al., 2003 ; Willats et al., 2001). A ce jour, une discussion est ouverte au sujet de l'identification du squelette par rapport aux chaînes latérales (Vincken et al., 2003)

Le HG a pour structure une chaîne linéaire de résidus d'acide galacturonique sous la forme de  $\alpha$ -(1,4)-D-galacturonate (GalA) (Fig. 14). Parmi les HG, sont présents les xylogalacturonanes, qui eux, ont des branchements constitués de résidus xylose.

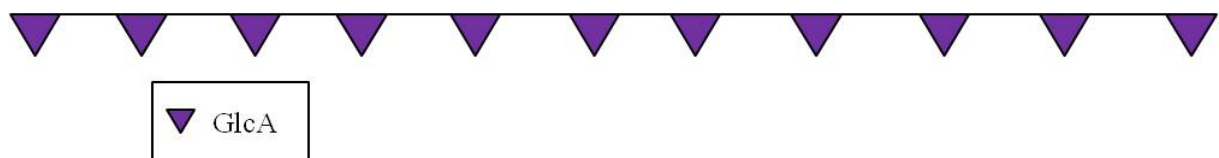


Figure 14 : Structure d'un HG.

Le RG-I est composé d'une alternance d'acide galacturonique et de rhamnose et pourrait avoir une chaîne latérale contenant d'autres domaines pectiques (Vincken et al., 2003). La figure 15 montre un exemple de structure de RG-I de *Solanum tuberosum*.

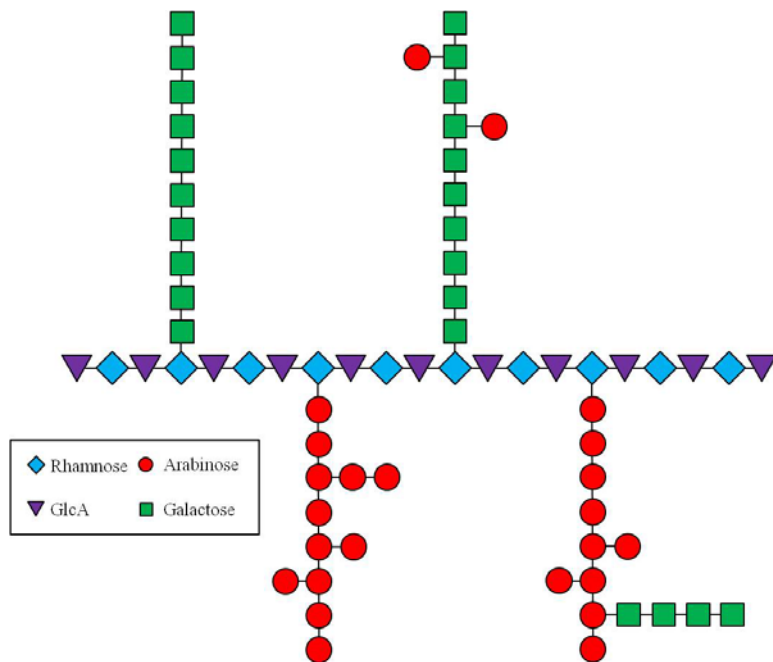


Figure 15 : Structure d'un RG-I de *Solanum tuberosum* d'après (ØBro et al., 2004). (a) galactane linéaire, (b) arabinogalactane I, (c) arabinane branché et (d) arabinane putatif avec un branchement galactane.

Le RG-II est un domaine pectique complexe qui contient 11 monosaccharides différents et pouvant former des dimères (Fig. 16) (Carpita & Gibeaut, 1993 ; O'Neill & York, 2003). Des arabinanes et des arabinogalactanes peuvent être liés au RG-II et auraient comme rôle d'apporter de la flexibilité à la paroi (Jones et al., 2003) et de permettre des liaisons avec la cellulose (Zykwinska et al., 2005). La figure 17 montre la structure d'arabinane issu d'*Arabidopsis thaliana* qui est composé d'un squelette de  $\alpha$ -(1,5)-L-arabinose avec des ramifications en  $\alpha$ -(1,2) et/ou  $\alpha$ -(1,3).



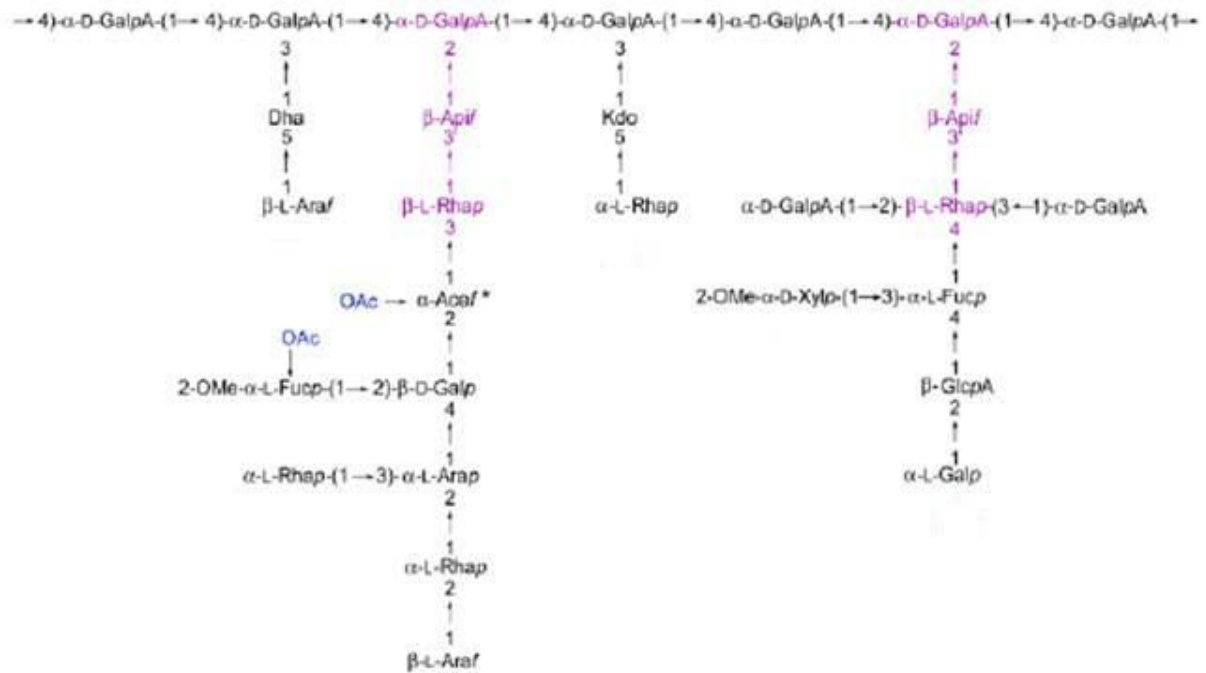


Figure 16 : Structure de RG-II. La chaîne principale est ramifiée avec quatre types de chaînes latérales (Source : <http://www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/projects/RGII.htm>, Centre for carbohydrate chemistry, University of East Anglia, Royaume-Uni)

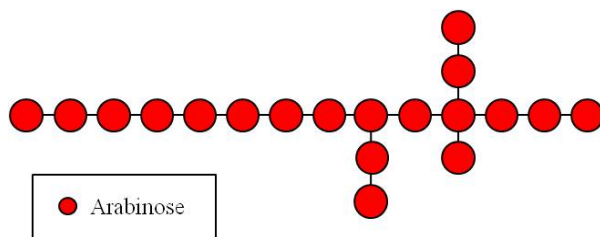


Figure 17 : Structure de l'arabinane d'*Arabidopsis thaliana*.

### III.2 La paroi secondaire

Elle est composée de cellulose, d'hémicellulose et de lignine.

Contrairement aux parois primaires, les hémicelluloses principales des parois secondaires sont les xylanes. Leur squelette est composé de  $\beta$ -(1,4)-D-xylose pouvant être substitué par des résidus de D-glucuronate en  $\alpha$ -(1,2), par des résidus de L-arabinose en  $\alpha$ -(1,2) ou  $\alpha$ -(1,3), ou les deux. Ils seront donc appelés : xylanes, glucuronoxylanes, arabinoxylanes ou glucuronoarabinoxylanes, respectivement.



La lignine est présente exclusivement dans les parois secondaires. C'est un polymère de monolignols dont les monomères sont l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool synapylique.

### III.3 Les polysaccharides de la paroi cellulaire (PPC) du caféier

Les polysaccharides sont les principaux constituants du café vert et torréfié qui jouent un rôle dans le caractère final à la tasse (Illy & Viani, 1995). Chez *C. arabica*, les polysaccharides constituent 48 à 60% de la graine verte (Wolfrom & Patin, 1965 ; Wolfrom et al., 1960 ; Clifford & Willson, 1985). Trois types de polysaccharides sont prédominants dans le grain de café vert : la cellulose, les arabinogalactannes de type II et les galactomannanes (Wolfrom et al., 1960 ; Fischer et al., 2001 ; Bradbury, 2001). Les galactomannanes prédominent avec 50% des polysaccharides. Les arabinogalactannes sont les deuxièmes plus répandus (30%) suivis par la cellulose (15%) et la pectine (5%). En dépit de leur importance, les caractéristiques structurales des polysaccharides ne sont pas encore totalement élucidées. Dans le café vert, seules les structures des galactomannanes, arabinogalactannes-protéines et pectines ont été partiellement caractérisées (Bradbury, 2001 ; Redgwell et al., 2002).

#### III.3.a Les galactomannanes

Chez les caféiers, les galactomannanes consistent en un squelette de résidus  $\beta$ -1,4 mannose. A des intervalles variables le long du squelette, des résidus uniques de galactose sont liés à l'O-6 du résidu  $\beta$ -1,4 mannose (Fig. 18) (Wolfrom et al., 1961 ; Fischer et al., 1999). Sutherland et al. (2004) ont montré que les mannanes se retrouvent dans l'ensemble de la paroi cellulaire. Dans la graine, la fréquence moyenne de ces branchements de galactoses n'est pas encore totalement identifiée. En effet, la littérature rapporte un ratio Gal/Man entre 1:130 (Bradbury & Halliday, 1990) et 1:30 (Fischer et al., 2001) même si aucune de ces deux études ne représente la totalité des galactomannanes pariétaux. Redgwell et al. (2003) ont pu déterminer l'évolution du ratio Gal/Man au cours du développement de la graine de café. A 11 SAF, les galactomannanes représentent environ 10% des polysaccharides et sont hautement substitués avec un ratio Gal/Man entre 1:2 et 1:7. Au fur et à mesure de la maturation de la graine, les galactomannanes deviennent les polysaccharides majoritaires jusqu'au maximum à la 31<sup>ème</sup> SAF pendant laquelle ils atteignent 50% des polysaccharides. Cependant ils sont moins substitués et le ratio Gal/Man varie de 1:7 à 1:40. Le degré de substitution des galactomannanes dans la graine de café serait régulé par le développement. Les

galactomannanes hautement ramifiés sont plus solubles dans l'eau que des galactomannanes non ramifiés. Cela est en adéquation avec le durcissement de la paroi des graines au cours du temps (Clifford, 1985). Un autre exemple de l'augmentation de la solubilité avec la substitution est la gomme de guar avec un ratio Gal/Man de 1:2 (Joersbo et al., 2001).

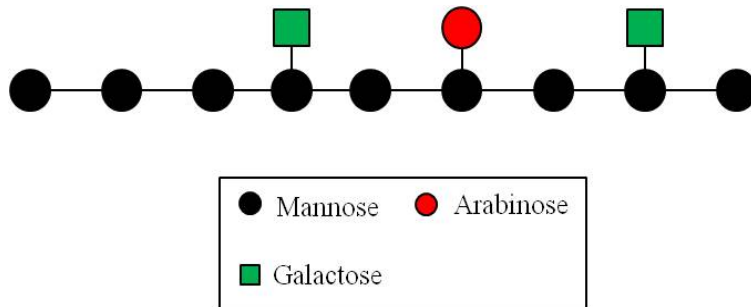
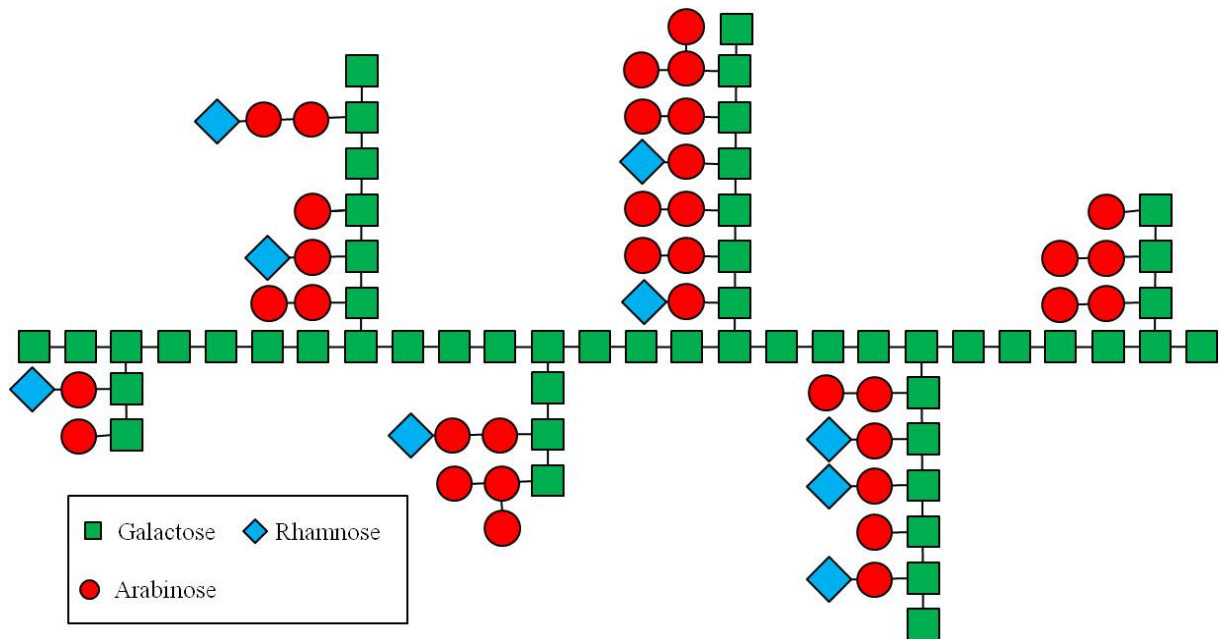


Figure 18 : Structure d'un galactomannane de café (Moreira et al., 2012)

### III.3.b Les arabinogalactanes

Les arabinogalactanes de type II sont présents dans la graine de café (Wolfrom & Patin, 1965 ; Bradbury, 2001). Ils sont composés d'une chaîne principale de 1-3 galactoses liés en O-6 avec une chaîne latérale contenant des résidus d'arabinose et de galactose (Fig. 19) (Fischer et al., 1999, 2001).

La teneur en arabinogalactanes diminue au cours du développement jusqu'à 34% de la teneur totale en polysaccharides (Redgwell & Fischer, 2006). Le ratio Gal/Ara a été étudié au cours du développement de la graine de café. Il augmente au cours de la croissance de 1.3 :1 pour atteindre 2.6 :1 pour des graines à maturité. Sutherland et al. (2004) ont montré que les arabinogalactanes sont situées dans l'ensemble de la paroi cellulaire sauf dans la lamelle moyenne. Les arabinogalactanes-protéines peuvent contenir des résidus rhamnoarabinose et rhamnoarabinoarabinose (Nunes et al., 2008)



**Figure 19 : Structure putative d'un arabinogalactane d'une graine de café mature (Redgwell et al., 2002 ; Nunes et al., 2008).**

### III.3.c Les autres polysaccharides

#### \* Les glucomannanes et les galactoglucomannanes

Les glucomannanes sont présents dans les feuilles de café mais leur présence dans les graines est toujours discutée (Lima et al., 2013). Les galactoglucomannanes pourraient être présents dans les graines (Fischer et al., 2001).

#### \* Les arabinoxylanes

Les arabinoxylanes sont présents dans les feuilles de caféiers, mais pas dans les graines (Cecy & Correa, 1984 ; Lima et al., 2013).

#### \* Les xyloglucanes

Les xyloglucanes sont présents dans les graines de café et les feuilles (Cecy & Correa, 1984; Kacurakova et al., 2000 ; Oosterveld et al., 2003 ; Lima et al., 2013).

## IV. Deux composés biochimiques : l'acide chlorogénique et la caféine

De nombreuses publications décrivant la teneur en composants majoritaires des graines matures de café sont disponibles dans la littérature. Parce qu'ils ont un impact sur la qualité de la tasse, une attention spéciale a été portée sur le transport et l'accumulation de la caféine et des acides chlorogéniques dans la graine et la plantule.

Les facteurs environnementaux et les conduites culturales modifient la physiologie du développement de la graine. Par exemple, chez *C. arabica*, des durées de développement et de maturation longs et des fruits plus gros sont observés habituellement sur des plants poussant à haute altitude ou à l'ombre (Guyot et al., 1996 ; Muschler, 2001 ; Vaast et al., 2006). La compréhension des voies métaboliques dans la graine de café ou dans la plante entière est essentielle notamment pour la recherche de gènes candidats qui seraient liés à la qualité du café.

Les composés de stockage majoritaires de la graine mature de *C. arabica* sont 1°/ les polysaccharides pariétaux constituant 48-60% de la matière sèche (MS) (Redgwell et al., 2002 ; Redgwell et al., 2003), 2°/ les lipides (13-17% MS), principalement les triacylglycérols (TAG) (Speer & Kölling-speer, 2006), 3°/ les protéines (11-15% MS) (Clifford & Kazi, 1987), 4°/ le saccharose (7-11% MS) (Campa et al., 2004), et 5°/ les acides chlorogéniques (ACG) (5-8% MS) (Smith, 1963 ; Ky et al., 2001).

### IV.1 Acides chlorogéniques

#### IV.1.a Généralités

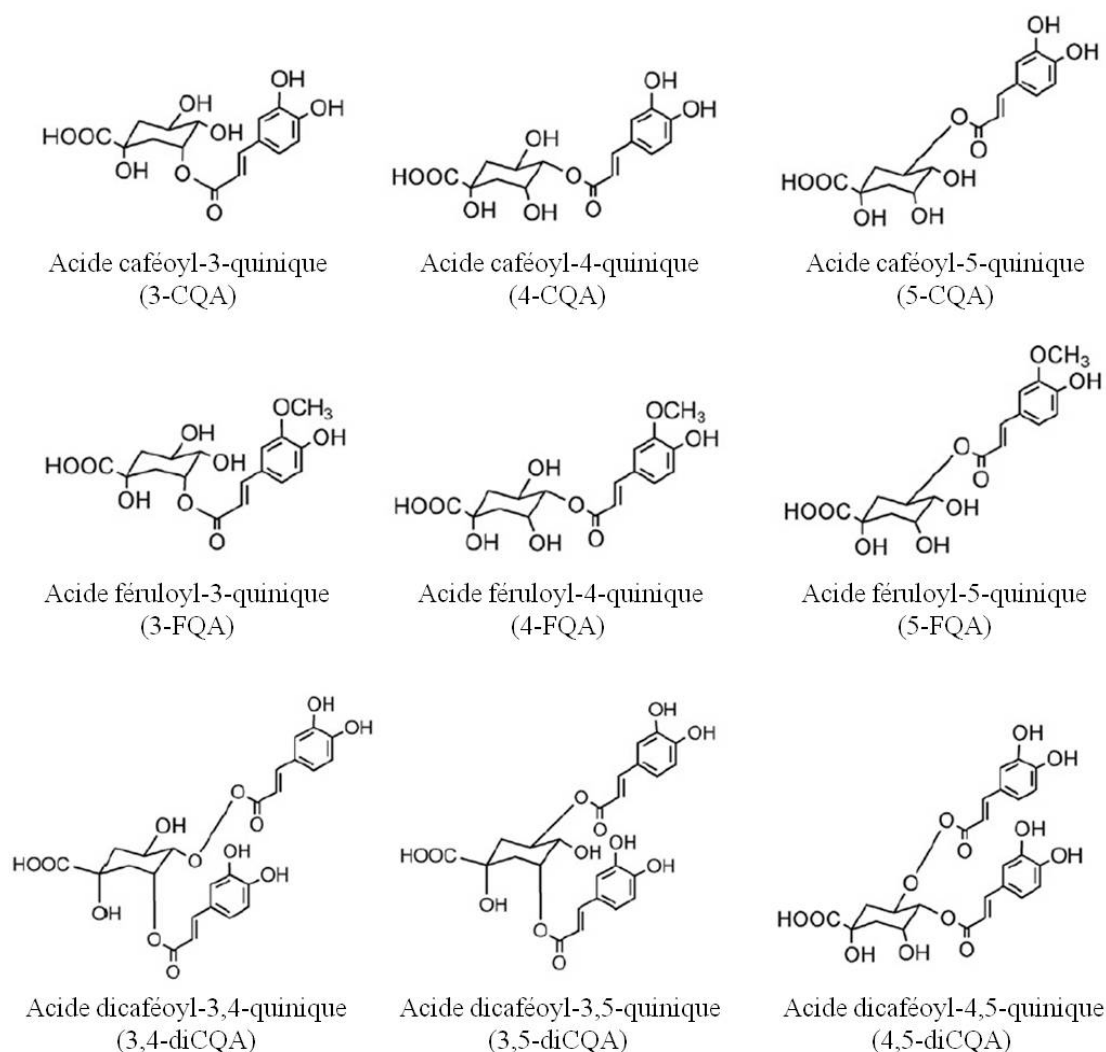
Les acides chlorogéniques (ACG) constituent une famille d'esters formés entre les acides transcinnamiques (caféique et férulique) et l'acide quinique (Hanson, 1965 ; Clifford, 1985). Il y a trois groupes principaux : acides caféoylquiniques (CQAs), acides dicaféoylquiniques (diCQAs), acides féruloylquiniques (FQAs). Chaque groupe contient trois isomères (Clifford & Staniford, 1977). Pour les CQAs, ce sont l'acide caféoyl-3-quinique (3-CQA), l'acide caféoyl-4-quinique (4-CQA) et l'acide caféoyl-5-quinique (5-CQA), ce dernier étant l'acide chlorogénique *sensu stricto*. En ce qui concerne les diCQAs, nous avons l'acide dicaféoyl-3,4-quinique (3,4-diCQA), l'acide dicaféoyl-3,5-quinique (3,5-diCQA) et l'acide dicaféoyl-

4,5-quinique (4,5-diCQA). Enfin les FQAs sont représentés par l'acide féruloyl-3-quinique (3-FQA), l'acide féruloyl-4-quinique (4-FQA) et l'acide féruloyl-5-quinique (5-FQA) (Fig. 20).

Les ACGs et leurs dérivés sont diversifiés et abondants dans le monde végétal (Clifford, 2000). Ils sont à la fois présents chez les plantes mono- et dicotylédones (Petersen et al., 2009). Mais les fortes teneurs sont surtout présentes chez les Rubiacées (caféiers (Sondheimer, 1964)), les Solanacées (tomate (Rhodes & Woollorton, 1976), tabac (Zucker & Ahrens, 1958), pomme de terre (Griffiths & Bain, 1997), aubergine (Sakamura & Obata, 1963)), les Astéracées (artichaut (Adzet & Puigmacia, 1985), tournesol (Milić et al., 1968)) et chez les Rosacées (pomme, poire, pêche (Sondheimer, 1964)).

Chez le café, les ACG sont des métabolites secondaires de grande importance économique : leur accumulation dans les grains de café vert contribue après torréfaction à l'amertume de la boisson (ils sont normalement astringents). Les ACG totaux des graines de café peuvent varier en fonction de l'espèce/la variété, le degré de maturation, les pratiques agricoles, le climat et le sol (Camacho-cristóbal et al., 2002 ; Campa et al., 2005 ; Clifford, 1985 ; Farah et al., 2005 ; Guerrero et al., 2001 ; Ky et al., 1999). Parmi les ACGs, le 5-CQA est le principal ester hydroxycinnamoyl soluble retrouvé dans le café (Aerts & Baumann, 1994 ; Clifford, 1979).

En fonction des espèces, la teneur en ACG varie grandement, de 0,14% MS chez *C. rhamnifolia* Bridson à 9,90% MS chez *C. sessiliflora* (Clifford & Jarvis, 1988 ; Clifford et al., 1989 ; Anthony et al., 1993 ; Rakotomalala et al., 1993). Ces composés phénoliques représentent en moyenne 4.1% et 11.3% de MS respectivement pour *C. arabica* et *C. canephora* (Ky, et al., 2001), et pourraient expliquer les différences de saveurs entre ces espèces (Clifford, 1985 ; Guyot et al., 1996). Le 5-CQA est un caractère très héritable et 80% des variations observées entre espèces sont d'origine génétique. Chez les autres isomères, l'influence de l'environnement sur leur teneur est plus élevée. Enfin, la teneur en ACG est additive, la moyenne d'hybrides F1 étant égale à la moyenne des parents pour ce caractère (Ky et al. 1999).



**Figure 20 : Acides chlorogéniques (ACG) des cafés**

#### IV.1.b Voie de biosynthèse

La biosynthèse du CQA se fait par la voie des phénylpropanoïdes dans laquelle la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est une enzyme clé (Howles et al., 1996). Elle catalyse la première étape dans cette voie et permet la synthèse d'une large gamme de composés chimiques comme les flavonoïdes, coumarines, esters hydroxycinnamoyls et la lignine (Hahlbrock & Scheel, 1989). La voie de biosynthèse des ACG inclut au moins cinq enzymes : la PAL (phénylalanine ammonia-lyase), la C4H (cinnamate-4-hydroxylase), la 4CL (4-[hydroxy]cinnamoyl-CoA ligase), la C3H (*p*-coumaroyl-shikimate/quinate 3'-hydroxylase) et l'HCT (hydroxycinnamoyl CoA: quinate hydroxycinnamoyl transférase) (Fig. 21) (Campa et al., 2003 ; Hoffmann et al., 2003). Le passage des CQAs vers les diCQAs est encore inconnu.

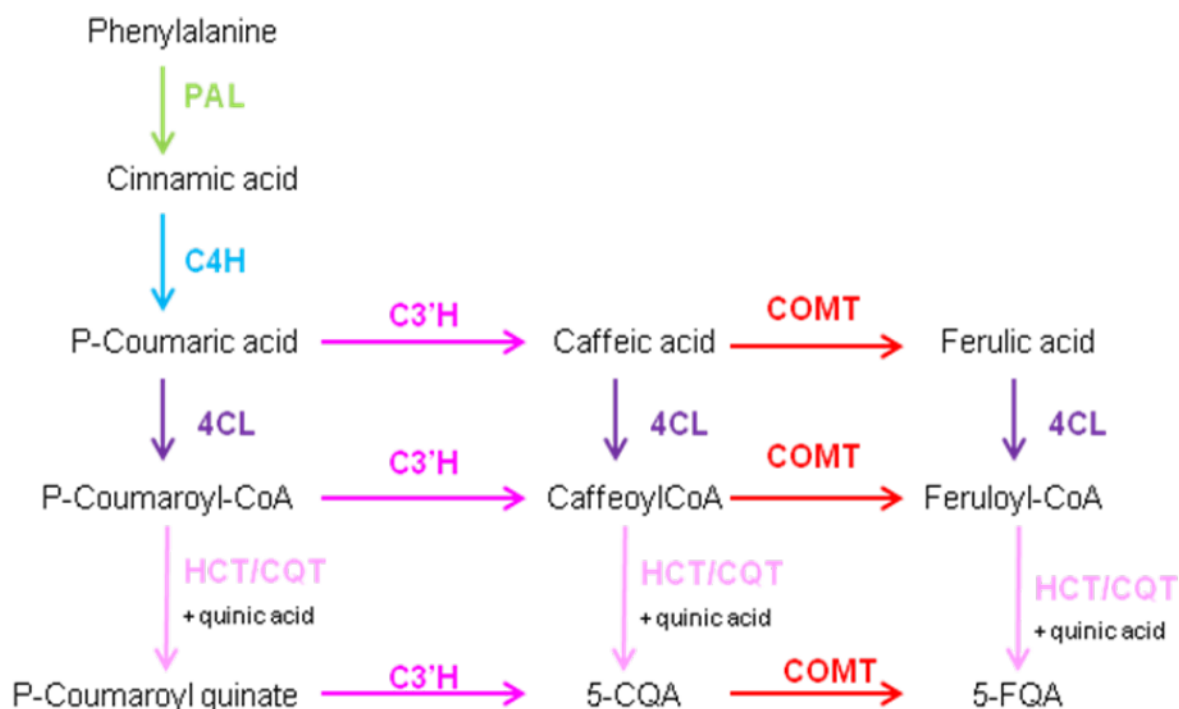


Figure 21 : Voie de biosynthèse des ACG

#### IV.1.c Localisation *in situ*

Les acides hydroxycinnamoylquinniques sont accumulés dans les vacuoles ou dans l'apoplaste lors du vieillissement des feuilles de tabac (Takahama, 1998). Chez les caféiers, le 5-CQA peut être vacuolaire ou associé à la paroi cellulaire (Mösli Waldhauser & Baumann, 1996). La biosynthèse du CQA chez le pétunia nécessite plusieurs organites dont le dernier avant le stockage serait le chloroplaste, la transférase étant chloroplastique (Ranjeva et al., 1977).

Chez les feuilles de caféiers, les CQA ont pu être localisés en utilisant la microscopie à épifluorescence (Mondolot et al. 2006) et plus récemment la microscopie multiphotonique couplée à l'analyse spectrale (Conéjéro et al., 2014). Dans la feuille mature, les ACGs sont situés dans les vaisseaux vasculaires, dans la cuticule de l'épiderme abaxial et, dans une moindre mesure, dans les cellules de l'épiderme abaxial. Surtout leur localisation change au cours de la croissance de la feuille, étant présent dans l'ensemble des tissus chez la feuille jeune. Chez les graines, les ACGs ont été localisés dans les parois (Dentan, 1977).

#### IV.1.d Localisation et expression des gènes

Deux gènes de la voie de biosynthèse des CQAs ont été localisés sur la carte génétique réalisée à partir du croisement (*C. pseudozanguebariae* x *C. liberica dewevrei*) x *C. liberica dewevrei*. Ce sont les gènes codant respectivement pour la PAL1 (Mahesh et al., 2006) et la CaCOMT (Campa et al. 2003).

Joët et al. (2009) ont pu identifier quelques gènes qui seraient des points de contrôles transcriptionnels dans la voie de biosynthèse des ACG dans la graine en formation. Tout d'abord, les gènes codant pour PAL1, PAL2, C4H, deux 4CL et trois CCoAOMT, présentent un fort niveau d'expression aux stades 3 et 4, c'est-à-dire au moment où l'endosperme a une croissance rapide.

L'expression de ces gènes coïncide avec la biosynthèse maximale des ACGs. D'autres gènes codant pour des enzymes putatives comme la 4CL et la C3H pourraient aussi être liés à l'activité biosynthétique des ACG avec une expression maximale au stade 3 (15 SAF). D'autre part, le gène *HCT1* pourrait être impliqué directement dans l'anabolisme de l'acide cafféoyl quinique.

Enfin, un autre gène de la voie des phénylpropanoïdes, le profil d'expression d'*HQT* n'est pas corrélé au profil d'accumulation des ACG. Son transcrit est limité au péricarpe et n'est pas directement impliqué dans l'accumulation des ACG dans l'endosperme.

Au stade 6 (32<sup>ème</sup> SAF), la teneur absolue en ACG diminue légèrement, ce qui pourrait être dû au réacheminement des ACG vers la biosynthèse de la lignine (Joët et al., 2009). Ainsi, la voie des phénylpropanoïdes pourrait être séparée en deux événements transcriptionnels indépendants pendant le développement de la graine : en 1<sup>er</sup> la synthèse des ACG pendant la transition péricarpe-endosperme ; en 2<sup>nd</sup> la remobilisation des ACG pour la biosynthèse de monolignol lors du durcissement de l'endosperme.

#### IV.1.e Accumulation des acides chlorogéniques

\* Dans les graines d'*Arabica*

Au cours du développement de la graine, la teneur en CQA s'accroît graduellement chez *C. arabica* (Koshiro et al., 2007). D'après Joët et al. (2009), les ACGs représentent 5% de la MS de la graine d'*Arabica* au stade 3 (11 SAF). La teneur en ACG est multipliée par quatre au stade 5 pour atteindre environ 20% de MS. Cette augmentation est principalement expliquée



par une forte augmentation de la teneur en 5-CQA, qui représente 82% des ACG totaux. Au-delà du stade 5, la teneur en ACG chute pour atteindre 7% MS au stade 7. A ce moment, les CQA ne représentent plus que 69% des ACG.

\* Dans les plantules d'*Arabica*

Peu d'études ont porté sur la composition en CQA chez les plantules de café. Aerts & Baumann (1994) ont observé chez *C. arabica* 'catuai' une relation entre la teneur en CQA, l'âge de la plantule, le type d'organe (racine, hypocotyle, cotylédon) et la présence de lumière. A l'obscurité, comme à la lumière, la teneur en CQA est plus élevée dans les cotylédons que dans l'hypocotyle et dans les racines où elle est quasi-nulle (Baumann & Wanner, 1972 ; Aerts & Baumann, 1994). Cependant, des ACG seraient présents dans les racines (El Hamidi & Wanner, 1964).

\* Dans les cultures cellulaires d'*Arabica*

Dans les cultures cellulaires, l'accumulation des ACG présente deux pics : l'un au début et l'autre à la fin de la phase de croissance de la culture (Baumann & Rohrig, 1989). Enfin, dans les suspensions cellulaires poussant à l'obscurité, la production des ACG est résiduelle. Elle est multipliée par 100 à la lumière (4 mg.g<sup>-1</sup> MF) (Baumann et al., 1991).

## IV.2 La caféine

La caféine a été découverte dans le thé (*Camellia sinensis*) et le café (*C. arabica*) dans les années 1820 (Kihlman et al., 1974). C'est un alcaloïde purine (le 1,3,7-triméthylxanthine) dérivant de la xanthosine (Fig. 22). Son influence sur le système nerveux central est bien connue et en particulier ses effets sur le sommeil (insomnies) (Nehlig et al., 1992). D'autre part, elle aurait un effet bénéfique sur le foie, et diminuerait les risques de développement de la maladie de Parkinson. La caféine (Arendash et al., 2006, 2009), l'acide chlorogénique (Kwon et al., 2010) ou leur combinaison (Cao et al., 2011) pourraient protéger des dégénérescences cognitives dues à la maladie d'Alzheimer. Cependant la caféine a un effet négatif sur le diabète de type II en augmentant par 15 à 30% la résistance à l'insuline (Beaudoin & Graham, 2011). Son accumulation dans les graines influe sur la qualité de la tasse en augmentant son amertume, d'autant qu'elle n'est pas détruite par la torréfaction.

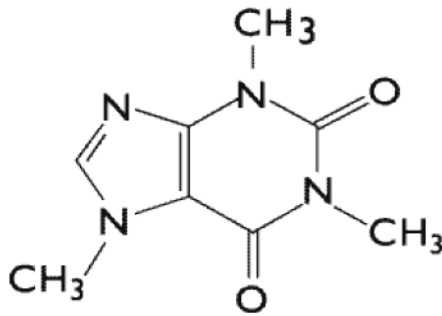


Figure 22 : Molécule de caféine

#### IV.2.a Voie de biosynthèse

Trois étapes de méthylations sont nécessaires pour produire la caféine à partir de la xanthine, impliquant successivement l'action de différentes enzymes : la 7-méthylxanthosine synthase (xanthosine > 7-méthylxanthosine), théobromine synthase (7-méthylxanthine > théobromine ou 3,7-diméthylxanthine) et caféine synthase (théobromine > caféine ou 1,3,7-triméthylxanthine), utilisant le S-adénosyl-L-méthionine (SAM) comme donneur de groupe méthyle (Fig. 23). Plusieurs études ont été publiées sur l'analyse d'expression et l'étude protéique des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la caféine (Moisyadi et al., 1998, 1999 ; Ogawa et al., 2001 ; Mizuno et al., 2003 ; Uefuji et al., 2003).

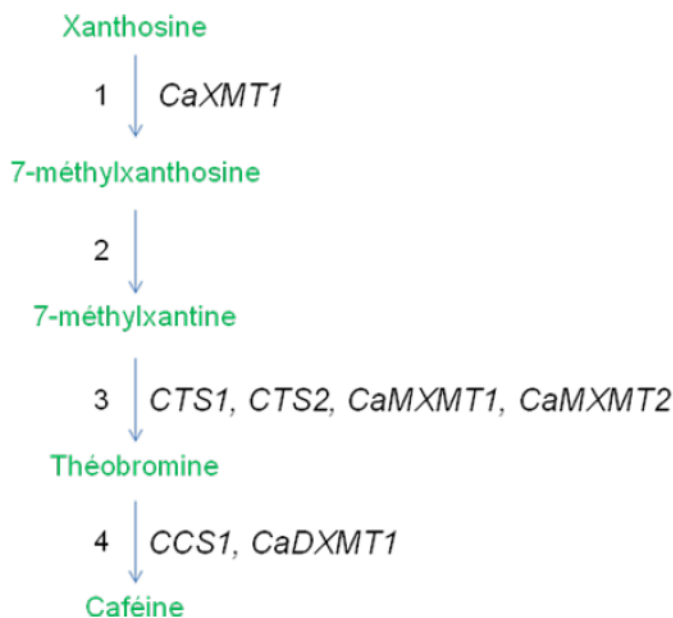


Figure 23 : Voie de biosynthèse de la caféine (1) 7-méthylxanthosine synthase (xanthosine N-méthyltransférase) ; (2) N-méthylnucléosidase ; (3) théobromine synthase (monométhylxanthine N-méthyltransférase) ; (4) caféine synthase (diméthylxanthine N-méthyltransférase) (Adapté de Ashihara et al., 2008)

Dans certains cas, l'analyse de l'expression a été réalisée sans séparer le péricarpe, l'endosperme et les tissus du péricarpe ou encore sans donner d'information sur les dates, l'âge ou la façon de récolter les échantillons, ce qui rend l'interprétation des résultats assez difficile notamment sur l'expression tissu-spécifique.

Le profil d'expression de la caféine synthase et de la xanthosine N-méthyltransférase correspond à l'augmentation de caféine observée par Keller et al. (1972) entre la 7ème et la 17ème SAF (Salmona et al., 2008). Les gènes codant pour la théobromine synthase (appelée *CaMXMT1* et *CaMXMT2* par Uefuji et al. (2003) ou *CTS1* et *CTS2* par Mizuno et al. (2003)) et la caféine synthase (appelée *CaDXMT1* par Uefuji et al. (2003) ou *CCSI* par Mizuno et al. (2003)) sont exprimés dans les fruits immatures (stades 3-4). L'expression du gène *CaMXMT2* est élevée non seulement dans tout le jeune fruit vert (diamètre de 10mm) mais aussi dans le péricarpe et l'endosperme immature de fruits plus grands (diamètre de 15mm) (Mizuno et al., 2003). Les gènes *CaXMT1*, *CaMXMT1*, *CaMXMT2* et *CaDXMT1* ne s'expriment pas dans les fruits matures (Uefuji et al., 2003), ce qui pourrait expliquer l'absence d'accumulation de caféine pendant le stade final de maturation. L'expression des gènes *CaXMT1*, *CaMXMT1* et *CaMXMT2* est aussi détectée dans les tissus riches en divisions cellulaires comme dans les jeunes feuilles et les bourgeons floraux – tissus où les N-méthyltransférases sont abondantes. La localisation sur le génome de *C. canephora* des gènes intervenant dans la biosynthèse de la caféine a été récemment réalisée (Denoeud et al., 2014). Parallèlement, Perrois et al. (2014) ont étudié la différence de régulation du métabolisme de la caféine dans les feuilles et graines de *C. arabica* et *C. canephora*.

#### IV.2.b La teneur en caféine dans la graine

Selon les espèces de caféiers, la teneur en caféine (CAF) varie de 0,01% (*C. pseudozanguebariae*) à 3,19% (*C. canephora*) (Charrier & Berthaud, 1975 ; Anthony et al., 1993 ; Ky et al., 2001). Charrier & Berthaud (1975) ont montré que chez *C. canephora*, la teneur en caféine varie entre génotypes, clones et provenances mais aussi d'une graine à l'autre et représentait de 1.2% à 3.5% de MS. Les graines de BP contiennent un taux moyen de caféine (0.5-0.7%) (Charrier & Berthaud, 1975 ; Baumann et al., 1998 ; Chaves et al., 2004). Il est comparable à celui trouvé chez *C. eugenioides* (Charrier & Berthaud, 1975 ; Anthony et al., 1993 ; Mazzafera et al., 1997 ; Ky et al., 2001), et surtout, il est en moyenne deux fois moins élevé que chez les autres variétés d'Arabica, dont le Bourbon.

Chez les caféiers, la teneur en caféine résulte du processus d'accumulation dans le grain vert qui dépend du temps de fructification (FT), et de l'accumulation journalière de caféine (Akaffou et al. 2003). En génétique quantitative, la teneur en caféine est un caractère fortement héritable. De plus, c'est un caractère additif après transformation « racine carrée » (Barre et al., 1998). Enfin, récemment deux gènes majeurs ont été localisés sur le génome expliquant 96% de la variation de teneur en caféine observée dans le croisement (*C. pseudozanguebariae* x *C. liberica dewevrei*) x *C. liberica dewevrei* (Ky et al. 2013).

Pendant le développement des graines, la principale augmentation de la teneur en caféine (CAF) se passe entre les stades 3 et 4 pour Keller et al. (1972) et entre les stades 3 et 5 pour Koshiro et al. (2006), c'est-à-dire à la fin lors de l'expansion de l'endosperme. De la 16<sup>ème</sup> à la 25<sup>ème</sup> SAF, la teneur en CAF augmente légèrement chez *C. arabica*, *C. canephora* et *C. liberica* (Clifford & Kazi, 1987). Il existe un transport important de la caféine du péricarpe vers la graine (Baumann & Wanner, 1972). Du stade 4 au stade 7, la quantité de caféine dans le péricarpe est constante suggérant que sa biosynthèse s'arrête ou bien continue mais avec un transport actif vers la graine (Baumann & Wanner, 1972).

Le lieu de synthèse de la caféine n'est pas entièrement élucidé mais pourrait avoir lieu dans l'endosperme aqueux, le périsperme et le péricarpe chez *C. arabica* (Gillies et al., 1995 ; Mazzafera et al., 1994 ; Keller et al., 1972 ; Söndahl & Baumann, 2001).

#### IV.2.c Dans les cultures cellulaires

Des expériences sur des cultures cellulaires de *C. arabica* ont mis en évidence l'influence de la lumière sur la teneur en caféine. Ainsi, les cellules sont plus riches en CAF à la lumière qu'à l'obscurité (0,39 mg.g<sup>-1</sup> MF vs 0,025 mg.g<sup>-1</sup> MF) (Baumann et al., 1991). Elles ont aussi montré les interrelations entre l'activité de la PAL et les teneurs en 5-CQA et en CAF, en présence ou non de la lumière (Mösl Waldhauser & Baumann, 1996). A l'obscurité, l'activité de la PAL et les teneurs en 5-CQA et en CAF sont résiduelles et seules de fortes concentrations en CAF (10 mM) dans le milieu peuvent induire une faible activité de la PAL. En revanche, la lumière augmente l'activité de la PAL, ainsi que les teneurs en 5-CQA et en CAF (avec 3 jours de retard pour cette dernière). Enfin, un feedback négatif existe entre la CAF, le 5-CQA et l'activité de la PAL : l'ajout de CAF dans le milieu prolonge l'activité de la PAL et augmente la concentration en 5-CQA.

Les cultures cellulaires ont aussi montré que la CAF diffuse dans le milieu de culture à l'obscurité, comme à la lumière (Baumann et al., 1991). En effet, la caféine est connue pour traverser librement les membranes (Pfrunder et al., 1980). A l'obscurité, la teneur est similaire ( $0,025 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MF}$ ) dans le tissu et le milieu. En revanche, la teneur en CAF à la lumière est nettement plus importante dans le tissu ( $0,39 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MF}$ ) que dans le milieu ( $0,075 \text{ mg.ml}^{-1} \text{ MF}$ ). Enfin, la suppression de la paroi cellulosique des protoplastes entraîne une perte de 98% de CAF présente dans le tissu qui se retrouve dans le milieu (Baumann et al., 1991). Ainsi, la CAF serait stockée dans la paroi cellulosique sous une forme limitant sa diffusion dans le milieu.

#### **IV.2.d Dans la plantule**

La CAF n'est pas répartie uniformément dans la plantule. Quel que soit le stade de développement de la plantule, les cotylédons sont les organes les plus riches en CAF. A l'opposé, elle est résiduelle ou absente dans les racines, l'hypocotyle ayant une teneur intermédiaire (El Hamidi & Wanner, 1964 ; Aerts & Baumann, 1994 ; Zheng & Ashihara, 2004). Cette différence entre organes est déjà visible chez la très jeune plantule (2 à 3 semaines), où les cotylédons renferment 98% de la CAF observée chez la plantule.

Chez les cotylédons, la teneur en CAF ne change guère (environ  $30 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ MF}$ ) à la lumière et à l'obscurité au cours des 7.5 premières semaines de développement. Au-delà (à l'ouverture des cotylédons), la teneur en CAF augmente jusqu'à atteindre  $40 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ MF}$  à la lumière et  $50 \text{ nmol.mg}^{-1} \text{ MF}$  à l'obscurité (Aerts & Baumann, 1994).

Dans les jeunes plants âgés de six mois, les jeunes feuilles et tiges, ainsi que les bourgeons, sont le lieu de biosynthèse de la CAF. En revanche, cette biosynthèse n'est observée ni dans les racines, ni dans les cotylédons âgés (Zheng & Ashihara, 2004). Chez la feuille, la caféine est activement synthétisée pendant leur émergence et ceci diminue ensuite lorsque les feuilles atteignent leur capacité photosynthétique maximale (Frischknecht et al., 1986 ; Ashihara et al., 1996 ; Zheng & Ashihara, 2004).

Pour des arbres de 2 ans, la quantité de caféine et sa teneur en % de MS dans la feuille diminue et les feuilles situées sur la partie basse de la plante (paires de feuilles 1 à 7) ont une teneur très faible (El Hamidi & Wanner, 1964). Baumann & Wanner (1972) ont mis en évidence chez de jeunes plantules un transport de CAF de la 1<sup>ère</sup> paire de feuilles vers la paire suivante plutôt que vers les cotylédons. Cependant, ce sont de faibles niveaux de caféine qui

ont été détectés dans la sève issue du xylème chez *C. arabica* cv. Catuai « Vermelho », suggérant qu'elle est peu transportée dans la plante et que la majeure partie de la caféine est synthétisée directement dans les tissus où elle est détectée (Mazzafera & Gonçalves, 1999). D'autre part, la caféine est métabolisée dans la feuille et non stockée (Kalberer, 1965 ; Baumann & Wanner, 1972).

La caféine posséderait des propriétés anti-mitotiques. Ainsi, Friedman & Waller (1983) ont montré qu'à une concentration de 10mM, la CAF inhibe le développement des radicules et les mitoses dans les plantules de *C. arabica*. Ceci suggère que les embryons de café (avec 40 à 60mM de caféine) développent des moyens pour contrer l'auto-inhibition de la mitose par la CAF en utilisant l'élongation cellulaire comme processus de croissance au tout début de la germination (1 à 4 jours après imbibition). Dans les racines, les divisions cellulaires commencent une fois que les extrémités sont hors de l'endosperme (riche en CAF) par élongation de l'hypocotyle. Dans les cotylédons embryonnaires, la CAF est introduite principalement après que la division cellulaire soit finie. Ainsi, les plantules peuvent éviter les effets négatifs de la caféine endogène sur la croissance en séparant les sites où la mitose se produit des sites où la caféine est stockée (Friedman & Waller, 1983). Enfin, il existe une forte corrélation entre la teneur en caféine de la graine et les cotylédons qui en émergent ( $r = 0.85$ ) (Baumann et al., 1998).

Même si aucune donnée n'est disponible pour l'activité enzymatique de la synthèse de la caféine pour chaque tissu du caféier, les résultats de De Castro & Marraccini (2006) suggèrent que l'expression des gènes codant pour les N-méthyltransférases est tissu-spécifique. De plus, la synthèse concertée de la caféine et de l'acide chlorogénique (principalement le 5-CQA) a été aussi reportée pendant le développement de la feuille de caféier (Aerts & Baumann, 1994 ; Baumann et al., 1993).

### IV.3 Complexe CAF-CQA

#### \* Généralités

La teneur en CAF des plantules dépend des organes et du stade de développement (Aerts & Baumann, 1994). Elle diffère aussi dans les feuilles et les graines chez les différentes espèces de caféiers (Silvarolla et al., 1999). A l'intérieur du grain, la teneur en caféine augmente au cours de sa maturation. Cette augmentation a été expliquée par le piégeage de la caféine par la formation d'un complexe avec l'acide chlorogénique présent dans la vacuole (Baumann & Rohrig, 1989) et appelé chlorogénate de caféine (Horman & Viani, 1972 ; Kappeler et al., 1987 ; Payen, 1846 ; Sondheimer et al., 1961). Il s'agit d'un complexe équimolaire (Horman & Viani, 1972) de liaison hydrophobe entre la partie caféique du CQA et la caféine. Le plan de la molécule de caféine est parallèle au plan de l'anneau aromatique caféoyl (Horman & Viani, 1972). Les acides chlorogéniques sont capables de se lier à d'autres alcaloïdes comme la théophylline, la paraxanthine, la théobromine ou la théacrine (Kappeler et al., 1987).

D'après nos connaissances, les graines de café contiennent plus d'ACG que de caféine (Campa et al., 2005). Des ACG libres sont donc présents dans la cellule. Cependant, leurs pourcentages ne sont pas les mêmes d'une espèce à l'autre et représentent entre presque 100% pour les espèces pauvres en caféine et 58.8% pour les espèces riches en caféine et en CGA (Campa et al., 2005). Chez *C. arabica*, environ 26% des ACG sont complexés avec la caféine et 35% chez *C. canephora* (Smith, 1963). Dans les feuilles âgées de trois semaines, 78,5% de la caféine ne sont pas complexés aux ACG. Cette proportion tombe à 60% vers 8 semaines et 40% vers 16,5 semaines (Baumann et al., 1991).

La formation de ce complexe expliquerait la distribution similaire dans les tissus de la caféine et de l'acide chlorogénique parmi les caféiers (Mösli Waldhauser & Baumann, 1996 ; Campa et al., 2005 ; Mondolot et al., 2006). Les graines de toutes les espèces de caféiers analysées sont caractérisées par une corrélation positive de la caféine et de l'acide chlorogénique : une absence ou une très faible teneur de caféine va avec une faible concentration d'acide chlorogénique et vice versa (Carelli et al., 1974 ; Clifford et al., 1989 ; Anthony et al., 1993).

#### \* Localisation cellulaire

La formation du chlorogénate de caféine permet une compartimentation de la caféine en la piégeant dans la vacuole des cellules en culture (Mösli Waldhauser & Baumann, 1996). Le

fait que moins de 0,1% de la caféine est libérée lors de l'imbibition de la graine suggère que la possibilité de diffuser au travers des membranes est inhibée (Baumann & Gabriel, 1984). Comme dans la graines, les acides chlorogéniques sont présents dans l'espace pérимembranaire (entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire) (Dentan, 1985), le chlorogénate de caféine serait aussi lié à la paroi cellulaire (Baumann, 2006). Cela pourrait jouer un rôle physiologique important en limitant l'inhibition de la croissance méristématique par la caféine (Mösli Waldhauser & Baumann, 1996).



## Chapitre II : Description du fruit et de la graine au cours de son développement chez Bourbon et Bourbon Pointu

La graine et le fruit ont été les premiers cas d'études de l'impact de la mutation *laurina* de cette thèse. En effet, cette mutation a donné naissance à un mutant de Bourbon dont les caractéristiques organoleptiques en font un café d'exception. Les deux variétés B et BP étant très proches, il est donc très intéressant de les comparer. Ces comparaisons reposent sur plusieurs aspects du développement du fruit et de la graine : 1/ au niveau morphologique, histologique et structural, 2/ au niveau biochimique et plus exactement sur la composition pariétale en mono- et polysaccharides, et 3/ au niveau des teneurs en caféine et en acide chlorogénique.

Ces trois aspects études ont donné lieu à une publication parue en 2014, et deux projets de publications dont un en cours de rédaction et un dont les résultats sont présentés sous forme d'ébauche d'article :

- (1) **Adler S, Verdeil J, Lartaud M, Fock-Bastide I, Joët T, Conéjéro G, & Noirot M (2014).** Morphological and histological impacts of the *laurina* mutation on fructification and seed characteristics in *Coffea arabica* L. *Trees*.
- (2) **Adler S, Mouille G, Citerne S, Fock-Bastide I, Noirot M.** Evolution of cell wall composition in monosaccharides over seed development in *Coffea arabica*. Comparaison between *Coffea arabica* 'Bourbon' and *Coffea arabica* 'Laurina'.
- (3) **Adler S, Palama T, Fock-Bastide I, Noirot M.** Evolution of caffeine and chlorogenic acid over development in *Coffea arabica* 'Laurina' seed.

Pour chaque partie, une synthèse des travaux est réalisée suivant le modèle d'un article scientifique : problématique, méthodologie, résultats et discussion. Ainsi, les trois thématiques sont abordées et les articles correspondants sont groupés à la fin de ce chapitre.

## **I. Impacts morphologiques et histologiques de la mutation *laurina* sur la fructification et les caractéristiques de la graine chez *Coffea arabica* L.**

### **I.1 Problématique**

Les développements histologique (Graner, 1936, 1938 ; Joshi, 1938 ; Leliveld, 1938 ; Fagerlind, 1939 ; Mendes, 1941 ; Chevalier, 1947 ; Dedecca, 1957 ; Vishveshwara & Chinnappa, 1965) et morphologique (Leon & Fournier, 1962 ; Wormer, 1964; Ramaiah & Vasudeva, 1969 ; Cannel, 1974 ; Srinivasan et al., 1978 ; De Castro & Marraccini, 2006 ; Salmona et al., 2008) des fruits et graines de café ont été assez largement étudiés. Ainsi, *C. arabica* a été décrit qualitativement (De Castro & Marraccini, 2006) et quantitativement (Cannel, 1974; De Castro & Marraccini, 2006; Leon & Fournier, 1962; Ramaiah & Vasudeva, 1969; Srinivasan et al., 1978; Wormer, 1964). Dans les études qualitatives, les phases de croissance sont déterminées grâce aux caractéristiques morphologiques (graine transparente, laiteuse ou dure), la taille du fruit (petit, en croissance ou mûrissement) et à la couleur du péricarpe (vert, jaune ou rouge). Trois grandes phases (Phase maternelle / Phase de développement de l'endosperme / Phase de maturation) divisées en 7 stades (Stades 1 à 7) rythment l'étude qualitative. D'autre part, les études quantitatives concernent le nombre de jours ou de semaines après la floraison (JAF ou SAF) et concerne le poids frais ou sec du fruit ou sa dimension (largeur et longueur). Afin de comparer au mieux la fructification de B et BP et de mettre en évidence d'éventuels effets de la mutation, nous avons suivi le développement morphologique chaque 2 semaine pour ces deux variétés. La première partie des résultats concerne la modélisation et la standardisation statistique de la croissance en longueur et en largeur des fruits, ce qui permet d'établir une relation avec les stades qualitatifs. La seconde partie de la comparaison repose sur l'étude de la structure histologique du fruit pour chacune des phases de développement par le biais de quatre dates clés. Enfin, la dernière partie s'intéresse aux graines à maturité et en particulier aux variations de forme chez les deux variétés, la relation de la forme de la graine avec l'épaisseur de la parche, ainsi que l'impact de l'ensoleillement chez BP.

## **I.2 Méthodologie**

Ce travail repose sur l'étude des deux variétés B et BP. Les arbres de B et BP sur lesquels ont été échantillonnés les fruits et les graines proviennent de 3 endroits différents sur l'Ile de La Réunion : le premier possède des B et BP voisins sur la même parcelle, le deuxième est composé de B et BP distribués aléatoirement, et pour le dernier, les BP sont répartis suivant un gradient d'ombrage.

Pour l'étude de la croissance des fruits au cours du temps, la date de floraison a été identifiée et la récolte a été réalisée chaque 2 semaines à partir de la 4<sup>ème</sup> SAF jusqu'à la 26<sup>ème</sup> SAF, ces dates représentant le début et la fin de la phase de croissance en taille des fruits. D'autre part, des fruits mûrs ont été récoltés, déulpés et séchés afin de faire les mesures sur la parche et les analyses sur les formes des graines. Enfin, pour étudier l'effet de l'ombrage sur la forme de la graine chez BP, les fruits ont été récoltés sur l'ensemble de la parcelle dont les arbres étaient exposés ou pas à la lumière.

La longueur et la largeur de ces fruits ont été mesurées pour chaque date de récolte. Leur taille étant assez hétérogène en fonction de la date de récolte, le fruit choisi pour être analysé est un fruit de longueur et de largeur médiane. Les études histologiques reposent sur l'utilisation de deux types de microscopes : 1/ le microscope optique pour avoir une vue d'ensemble de la coupe transversale du fruit ; 2/ le microscope multiphoton afin d'avoir une image nette sur un seul plan de parties précises de la coupe grâce à l'autofluorescence de certains composés chimiques. Des coupes histologiques fines ont donc pu être obtenues et les mesures histologiques réalisées grâce au logiciel ImagJ. La régression non linéaire des moindres carrés et l'ajustement simultané des deux courbes de croissance ont été utilisés afin d'élaborer un modèle complet du développement des fruits de B et BP.

La forme (longueur et largeur) des graines a été étudiée à partir du scan des graines et l'utilisation du logiciel ImagJ. L'étude de la parche repose sur la pesée des graines avec et sans parche et la mesure de son épaisseur. Compte-tenu de l'existence de différentes formes chez les deux variétés, quatre modalités de forme de graines ont été utilisées : BP-pointue, BP-ronde, B-pointue et B-ronde.

L'analyse des variations de formes de la graine de BP repose sur la récolte de fruits issus d'arbres différents et de fruits issus d'un même arbre. Cet échantillonnage permet d'étudier la variabilité intra- et inter- arbre.

### I.3 Résultats

Etude du développement du fruit du stade 1 à 5 chez B et BP

Le développement du fruit du stade 1 à 5 chez B et BP a été modélisé suivant les mesures en longueur et largeur. Ces deux paramètres suivent un modèle sigmoïde de type :

1/ Longueur :  $y = 10,15/(1 + e^{-0,492(t-b)}) + 1,65$  où  $b(B) = 9,23$  et  $b(BP) = 10,43$  ;

2/ Largeur :  $y = M/(1 + e^{-0,438(t-9,19)}) + 1,08$  où  $M(B) = 8,96$  et  $M(BP) = 7,81$ .

Pour la longueur, le développement commence et finit plus tôt chez B et la longueur finale est la même chez B et BP. D'autre part, 95% de la taille finale est atteinte à la 15<sup>ème</sup> SAF pour B et 1 semaine plus tard chez BP. Au-delà la croissance ne représente que 0,5 mm, soit 5% de la longueur totale du fruit. Concernant la largeur, à  $t = 0$ , la taille de l'ovaire n'est pas différente entre les variétés, mais à  $t = 24$  SAF, elle l'est ( $B = 10,0$  mm,  $BP = 8,89$  mm,  $BP/B = 0,89$ ,  $p = 0,0067$ ). De plus, la croissance en largeur finit 1 semaine avant celle en longueur chez BP, ce qui explique des fruits plus allongés.

L'aire de la coupe transversale suit une fonction sigmoïde où il n'y a pas de différence variétale sauf pour la taille finale (atteinte vers la 18<sup>ème</sup> SAF) qui est plus grande chez B. Concernant la relation entre l'aire de la coupe et la largeur du fruit, il n'y a pas de différence variétale et 99.6% de la variance de l'aire est expliquée par la largeur du fruit. Cela suggère une forte co-régulation de la croissance entre la largeur du fruit et son épaisseur. La taille relative du péricarpe et de la loge ont été étudiées et la mutation n'a pas d'effets sur ces composantes.

Structure histologique du fruit pour des dates clés du développement

La structure interne du fruit est étudiée à 4 dates clés du développement : les semaines 6, 12, 16 et 20, représentant respectivement les stades 2, 3, 4 et 5. Les structures histologiques sont les mêmes entre variétés quelles que soient les stades de développement ainsi que la taille relative du péricarpe.

A la 6<sup>ème</sup> SAF, les graines de B et BP n'ont pas encore leur forme classique (zone du placenta et le funicule visibles). Le mésocarpe est divisé en deux zones principales : la zone parenchymateuse (la plus externe) avec de grandes cellules, et la zone d'ombre (la plus interne) composée de petites cellules polygonales avec un noyau rond central typique du tissu méristématique. L'endocarpe est composé de 3 couches de cellules visibles aux parois fines et allongées. A la 12<sup>ème</sup> SAF, la taille des fruits est hétérogène dans une même inflorescence confirmant l'avantage d'utiliser la médiane des fruits comme référence. Les cellules polygonales de la zone méristématique ont des parois épaisses et constituent la parche. Les trois couches cellulaires composant l'endocarpe semblent comprimées et mortes. L'endosperme est visible et sa taille relative suggère une transition entre les stades 2 et 3 après la 6<sup>ème</sup> SAF. A la 16<sup>ème</sup> SAF, les fruits sont au stade laiteux. Les cellules de la parche sont épaisses et leur surface chez BP est supérieure à B. L'endosperme est de consistance souple du fait de la finesse des parois des cellules. Les noyaux sont proches de la paroi, indiquant la fin de la division cellulaire, même si des traces récentes de mitose sont observées. A la 20<sup>ème</sup> SAF, 99.7% de la croissance du fruit est finie et les seules modifications concernent l'endosperme, pour lequel il n'y a aucune différence claire entre les variétés. Au-delà et jusqu'au stade 7, il devient dur, ce qui est dû à l'épaississement des parois cellulaires.

#### Variations morphologiques de la graine et de la parche

La morphologie des graines est étudiée. La variation de la morphologie des graines est due à la présence de graines plus étroites chez BP que chez B. Il y a une plus grande fréquence de graines de forme étroite chez BP (36%). Ceci serait dû à l'absence de relation entre la largeur et la longueur des graines de BP. Par contre, le nombre de fruits dans une inflorescence ne modifie pas la forme de la graine

En champ, des différences de formes de graines de BP ont été mises en évidence et dépendent de l'emplacement sur la parcelle et de l'ensoleillement de l'arbre. Les trois sources de variabilités de la forme de la graine – entre inflorescences, entre fruits d'une même inflorescence et dans un fruit – représentent respectivement 36, 36 et 28% de la variabilité dans un arbre.

#### Etude de l'épaisseur de la parche au stade 7 chez B et BP

Le poids de la parche est plus élevé chez BP que chez B. Le ratio poids de la parche/poids de la graine est plus élevé pour les graines pointues par rapport aux rondes pour B et BP. La plus

grande fréquence des graines pointues chez BP expliquerait le ratio élevé, ou vice versa. Enfin, la mutation a un effet sur l'épaisseur de la paroi des graines BP-pointues uniquement.

## I.4 Discussion

A ce jour, aucune étude statistique comparant la croissance du fruit entre deux variétés n'a été réalisée en utilisant un modèle sigmoïde et une régression non-linéaire. Cela a été possible grâce au choix des fruits médians pour chaque date ainsi qu'à l'ajustement simultané des deux courbes. De précédentes études révèlent la diversité des saisons de floraison au sein des cultivars (Wormer, 1966), entre cultivars de *C. arabica* (Leon & Fournier, 1962) ou entre les espèces de caféiers. Les facteurs sous-jacents à ces différences pourraient être mis en évidence via la paramétrisation des courbes de croissance comme ce qui a été réalisé dans notre étude. La standardisation des courbes de croissances permettrait des comparaisons entre différents environnements, mais aussi l'étude fine de la composition des parois cellulaires au cours du développement. La paramétrisation de la croissance permettrait de faire un lien précis entre l'étude qualitative (les stades étant une forme de standardisation) et quantitative du développement du fruit.

L'unification des approches quantitative et qualitative du développement du fruit était nécessaire afin d'étudier à tous les niveaux les deux variétés de façon précise. De Castro & Marraccini (2006) et Salmona et al. (2008) avaient déjà caractérisé le développement de fruits de *C. arabica*. Nos résultats ne présentent pas de grandes différences avec le schéma déjà existant mais a permis d'avoir des **précisions supplémentaires concernant le développement du fruit**. Le développement est ainsi divisé en 2 grandes périodes : la croissance et la maturation. La croissance est partagée en 2 phases : la phase maternelle et la phase de croissance de l'endosperme. La 1<sup>ère</sup> phase correspond aux stades 1-2 (de la floraison à la 8<sup>ème</sup> SAF) et la 2<sup>ème</sup> phase correspond aux stades 3 (de la 8<sup>ème</sup> à la 15<sup>ème</sup> SAF), et 4 (de la 15<sup>ème</sup> à la 17<sup>ème</sup> SAF). Vient ensuite la période de la maturation qui est à son tour partagée en 2 phases identifiées par la couleur du péricarpe : péricarpe vert et péricarpe jaune à rouge. Le péricarpe vert correspond au stade 5 (de la 17<sup>ème</sup> à la 25<sup>ème</sup> SAF) et le péricarpe jaune à rouge correspondant aux stades 6 et 7 (de la 25<sup>ème</sup> SAF à la 34<sup>ème</sup> SAF) (Fig 1).

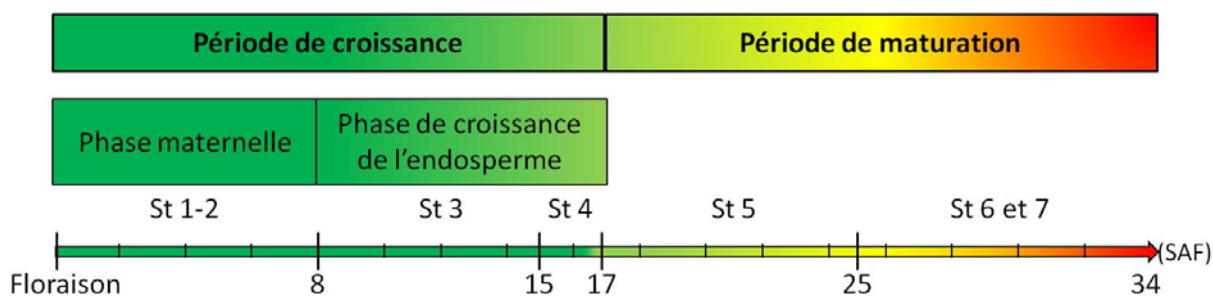


Figure 1 : Périodes, phases et stades caractérisant le développement du fruit de B et BP.

Chez le fruit de café, l'origine de la parche et de l'endocarpe est toujours controversée. La parche aurait pour origine l'endocarpe (Mendes, 1941 ; Dedecca, 1957 ; De Toledo, 1961 ; Vishveshwara & Chinnappa, 1965 ; De Castro & Marraccini, 2006) ou le mésocarpe (Chevalier, 1947). **D'après nos observations en microscopie multiphotonique confocale des fruits au cours de leur développement, la parche serait issue d'une zone méristématique au niveau du mésocarpe et l'endocarpe serait un tissu composé de 3 couches de cellules.**

La différence de variation de forme entre B et BP pourrait être expliquée par l'existence d'un parallèle entre le développement de la parche et de l'endosperme pendant les stades 3 et 4. A la 18<sup>ème</sup> SAF, la croissance en largeur est achevée pour les 2 variétés, mais celle en longueur continue uniquement pour BP (celle de B étant terminée). La lignification précoce des parois de la parche en largeur stopperait avant celle en longueur ce qui expliquerait des fruits et donc des graines plus étroites. A maturité, la parche des graines BP-étroites est plus épaisse que pour les autres types de graines. Or les graines aux formes allongées sont plus fréquentes sur des arbres poussant à l'ombre. **Donc l'environnement a un effet sur la forme des graines et cet impact pourrait être relié à l'hypersensibilité de BP à la lumière.**

## **II. Evolution de la composition en MPC et PPC de la graine de café au cours de son développement**

### **II.1 Problématique**

Des études préliminaires en microscopie multiphotonique sur des graines matures avaient mis en évidence un stockage de la caféine et de l'acide chlorogénique dans les parois végétales. Or, les parois végétales sont principalement constituées de polysaccharides. Donc nous nous sommes penchés sur l'évolution de la composition pariétale en mono- et polysaccharides au cours du développement de la graine. B et BP ayant des teneurs en caféine différentes, nous nous sommes demandé si la composition en polysaccharides de la paroi cellulaire (PPC) et monosaccharides de la paroi cellulaire (MPC) était différente entre variétés. Les profils d'accumulation en MPC ont été aussi étudiés au cours du développement afin de faire une éventuelle relation avec la caféine.

### **II.2 Méthodologie**

Le matériel végétal utilisé est le même que précédemment expliqué à savoir des fruits de B et BP issus du même champ récoltés chaque 2 semaines de la 8<sup>ème</sup> à la 32<sup>ème</sup> SAF. Le péricarpe a été enlevé et les graines ont été lyophilisées et finement broyées

L'étude de la composition en MPC a été réalisée suivant 3 étapes. La première consiste à isoler les résidus insolubles dans l'alcool grâce à une extraction à l'éthanol à 80°C. Le culot est ensuite hydrolysé avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 100°C. Le surnageant est appelé « fraction TFA » et est analysé en HPAEC-PAD afin d'identifier les monosaccharides hémicellulosiques. Le culot est hydrolysé à son tour avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et analysé en HPAEC-PAD pour déterminer la composition en monosaccharides celluloses ou fortement liés à la cellulose. Ces échantillons sont appelés « fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ».

La composition en polysaccharides de la paroi cellulaire (PPC) est déterminée par perméthylation suivant le protocole de Kim & Carpita (1992). Les polysaccharides sont ensuite hydrolysés, réduits et dérivés comme décrit par Burton et al. (2000). Ces dérivés sont analysés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS). Les expériences ont été réalisées de la 10<sup>ème</sup> à la 18<sup>ème</sup> SAF (durant la période de croissance maximale de la graine).



### II.3 Résultats

Les MPC identifiés dans la fraction TFA sont l'arabinose (Ara), le galactose (Gal), le glucose (Glu), le xylose (Xyl), le rhamnose (Rha) et le mannose (Man), mais pas de fucose ; et ceux identifiés dans la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sont Glu, Xyl et Man.

Le Glu de la fraction TFA semble être du 1,4-β-glucane et celui de la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de la cellulose et des glucanes. Le Xyl de la fraction TFA suggère l'existence de xylanes ramifiés, alors que celui de la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> serait issu de l'hydrolyse de xyloglucane. Pour le Gal, il proviendrait de galactanes plus ou moins ramifiés au cours du temps. L'Ara peut avoir plusieurs origines : des arabinanes, arabinogalactanes type I ou II et des arabinoxyanes. Le Man de la fraction TFA pourrait être issu de galactomannanes, qui sont connus pour être présents dans la graine de café alors que le Man de la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> semblerait provenir de glucomannane. Le Rha pourrait être inclus dans des chaînes latérales d'arabinogalactanes en tant que rhamnogalacturonan et/ou rhamnoarabinosyle.

La composition en MPC de la fraction TFA de la graine au cours de son développement a été étudiée. Une chute de la teneur en monosaccharides pariétaux de la graine est observée de la 8<sup>ème</sup> à la 32<sup>ème</sup> SAF (77.6% et 38.7% respectivement). Le glucose présent, qui est sous forme d'amidon, n'est pas considéré comme un MPC. Cependant il peut être considéré comme un marqueur important de l'endosperme de la graine sous la forme de l'équation :  $Y = (X - Glu_{min}) / (Glu_{max} - Glu_{min})$  où X est le niveau relatif de glucose, Glu<sub>max</sub> et Glu<sub>min</sub> sont les niveaux relatifs de glucose à la 8<sup>ème</sup> et à la 32<sup>ème</sup> SAF. L'endosperme représenterait donc 12, 86, 89 et 100% à la fin des stades 2, 3, 4 et 5 respectivement. Le Glu a été enlevé des prochaines analyses sur les teneurs en MPC. Les teneurs relatives en Man, Xyl, Gal, Ara ont été recalculées et utilisées pour la suite de l'interprétation des résultats.

La composition en MPC issus des PPC a été étudiée dans la fraction TFA. Une classification ascendante hiérarchique (CAH) a permis de diviser le développement de la graine en deux grands groupes dont le 1<sup>er</sup> est divisé en 2 phases : 1/ la phase 1 (φ 1) de la 8<sup>ème</sup> à la 14<sup>ème</sup> SAF, 2/ la phase 2 (φ 2) de la 14<sup>ème</sup> à la 20<sup>ème</sup> SAF et 3/ la phase 3 (φ 3) de la 20<sup>ème</sup> à la 32<sup>ème</sup> SAF.

La φ 1 est caractérisée l'absence de galactomannanes. Chez BP, une seule composante explique toute la variation de la composition en MPC opposant la 8<sup>ème</sup> à la 14<sup>ème</sup> WAF. Cette composante résume le trade-off entre les arabinoxyanes et les arabinogalactanes avec

l'augmentation des arabinoxyanes aux dépens des arabinogalactanes. Ce trade-off est plus fort chez B que chez BP à partir de la 12<sup>ème</sup> SAF. Pendant toute cette phase, la teneur et/ou la structure des arabinogalactanes sont différentes chez B et BP. La  $\phi$  2 est caractérisée par une seule composante explique toute la variation de la composition en MPC, opposant la 14<sup>ème</sup> SAF à la 20<sup>ème</sup> SAF. Au cours de cette phase, une forte augmentation des galactomannanes et une diminution des arabinoxyanes est présente. C'est le témoin de la transition entre les stades 3 et 4. Les teneurs relatives en MPC sont différentes entre B et BP à la 14<sup>ème</sup> SAF puis disparaissent à la fin de la  $\phi$  2. Pendant la  $\phi$  3, les teneurs en MPC se stabilisent. Les PPC présents sont les galactomannanes, les arabinanes, les arabinogalactanes et quelques arabinoxyanes. Il n'y a plus de différences variétales.

Concernant la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, les MPC représentent une part minoritaire des PPC de la graine. Une augmentation transitoire de xyloglucane est présente à la 14<sup>ème</sup> SAF. Il n'y a pas de différence entre B et BP. A partir de la 20<sup>ème</sup> SAF, il y aurait remobilisation de la cellulose pour synthétiser les glucomannanes.

## II.4 Discussion

Ce travail a pour objectif de caractériser les MPC et PPC des graines de B et BP au cours de leur développement.

Les PPC déduits des expériences de perméthylation sont les galactomannanes, arabinogalactanes, arabinanes, cellulose, xyloglucanes. Les arabinogalactanes et les mannanes (et/ou galactomannanes) composent principalement la graine de café mature (Wolfrom et al., 1960 ; Wolfrom et al., 1961 ; Wolfrom & Patin, 1964, 1965 ; Thaler & Arneth, 1968 ; Shadaksharaswamy & Ramachandra, 1968 ; Bradbury & Halliday, 1990 ; Nunes & Coimbra, 2001). Les arabinoxyanes (et glucuronoarabinoxyanes) ont été, à ce jour, identifiés uniquement dans la feuille de caféier (Cecy & Correa, 1984 ; Lima et al., 2013). Enfin, seuls les galactoglucomannanes ont été identifiés dans le café vert et pas (encore) les glucomannanes (Oosterveld, Coenen, Vermeulen, Voragen, & Schols, 2004). L'évolution de la composition en PPC et MPC a permis d'identifier 3 étapes dans leur accumulation au cours du temps.

Les stades 1-2 et 3 correspondent à la  $\phi$  1. Le péricarpe se développe puis est remplacé par l'endosperme aqueux. Les arabinoxyanes augmentent alors que les arabinogalactanes

diminuent. Ces deux PPC pourraient caractériser l'évolution du péricarpe et de l'endosperme. Ensuite, la fin du stade 3, le stade 4 et le milieu du stade 5 sont concomitants avec la  $\phi$  2. Pendant ces stades, l'endosperme passe d'un état aqueux à un état laiteux puis devient dur. La très nette augmentation des galactomannanes et la diminution du taux de ramification expliquerait le durcissement de la graine. Cette observation est cohérente avec la littérature (Fischer et al., 2001 ; Redgwell et al., 2003). De la deuxième moitié du stade 5 jusqu'au stade 6, l'endosperme est dur et les galactomannanes présents dans les échantillons sont peu substitués comme Redgwell et al. (2003) ont pu le trouver.

La mutation *laurina* a des effets sur la composition en PPC au cours du développement de la graine jusqu'à la 20<sup>ème</sup> SAF. Au-delà, B et BP ont la même composition en PPC. Les différences en composition de PPC pourraient être dues au décalage de croissance mis en évidence par Adler et al. (2014) entre B et BP. En effet, la croissance en longueur commence et finit 1 semaine avant chez B et la croissance en largeur finit une semaine avant chez BP. Les différences de PPC entre B et BP pourraient dépendre indirectement des différences de croissance au cours du temps et disparaissent à la fin de la  $\phi$  2 quand la croissance des deux variétés est terminée.

### **III Evolution des teneurs en caféine et en acide chlorogénique au cours du développement de la graine de *C. arabica* ‘Laurina’.**

#### **III.1 Problématique**

Une fois le développement de la graine de BP caractérisé de façon précise, l'étude de l'accumulation de la CAF et des CQA a pu être mise en place. Les graines de BP matures ont une teneur de 0,61 à 0,75% MS en CAF (Charrier & Berthaud, 1975 ; Clifford et al., 1989 ; Baumann et al., 1998) et d'environ 7% MS pour les CQA (Clifford et al., 1989 ; Joët et al., 2010). L'évolution de ces teneurs de la 16<sup>ème</sup> à la 35<sup>ème</sup> SAF a été étudiée pour *C. arabica*, *C. canephora* et *C. liberica* (Clifford & Kazi, 1987). Cependant, le suivi précis de leur accumulation au cours du temps en relation avec les descriptions quantitatives et qualitatives chez B et BP n'a jamais été réalisé.

#### **III.2 Méthodologie**

Des poudres de graines sans parche de la 8<sup>ème</sup> à la 32<sup>ème</sup> SAF ont été utilisées. L'extraction de la CAF et des CQA a été réalisée à l'éthanol à 80°C en trois fois. Le surnageant est récupéré et dosé en HPLC suivant trois répétitions techniques.

#### **III.3 Résultats**

L'accumulation de la caféine n'est pas linéaire au cours du développement de la graine de BP. Elle est composée de trois pics à la 16<sup>ème</sup>, 24<sup>ème</sup> et 28<sup>ème</sup> SAF. La teneur de la caféine à la 8<sup>ème</sup> SAF est de 0,32% MS et atteint 0,61% MS à la 32<sup>ème</sup> SAF.

Concernant le CQA, dès la 8<sup>ème</sup> SAF, sa teneur est de 1,3% MS. A la 16<sup>ème</sup> SAF, un pic atteignant 3,7% MS est présent, puis la teneur diminue et reste plutôt constante à 0,95% MS jusqu'à ce que la graine soit mature.

#### **III.4 Discussion**

La teneur finale en CQA est sous-estimée chez BP par rapport aux données de la littérature (7,6 fois moins). D'autre part, le profil de la courbe d'accumulation est fortement différent de celui habituellement observé chez *C. arabica* (Clifford & Kazi, 1987; Joët et al., 2009). Ces

résultats sembleraient suggérer un changement d'extractibilité en fonction du stade de développement et donc de composition de la paroi cellulaire.

Les expériences à venir vont porter sur l'amélioration de l'extraction de CQA (mélange méthanol:eau à différentes concentrations, sonication, chauffage).

**Article 1 : Morphological and histological impacts of the *laurina* mutation on fructification and seed characteristics in *Coffea arabica* L.**



























## **Article 2 : Evolution of cell wall composition in monosaccharides over seed development in *Coffea arabica*. Comparison between *Coffea arabica* ‘Bourbon’ and *Coffea arabica* ‘Laurina’**

*Authors:* Adler S, Mouille G, Citerne S, Fock-Bastide I, Noirot M

### **1. Introduction**

*C. arabica* ‘Laurina’, also known as Bourbon pointu (BP), is a natural mutant of *C. arabica* ‘Bourbon’ (B) (Chevalier 1947). The mutation is monolocus, recessive, and Mendelian (Krug et al. 1954), and leads to smaller internodes and leaves, as well as Christmas tree shape (Lécolier et al. 2009a, 2009b). Morphological and histological impacts of the laurina mutation have also been emphasized on fructification and seed characteristics (Adler et al., 2014). Three effects of the laurina mutation were highlighted: (1) fruit growth ended 1 week earlier in ‘Bourbon’, but without difference in fruit length. In contrast, fruits were wider on average in ‘Bourbon’; (2) the parchment of narrow seeds in ‘Bourbon pointu’ was thicker than in other ‘Bourbon pointu’ and ‘Bourbon’ seeds; and (3) the narrow seed frequency in ‘Bourbon pointu’ depended on environmental conditions.

Growth and maturation constitutes the two main key periods of the fruit development (Castro et al. 2006). The growth period can also be split into the maternal phase and the endosperm development phase. During the maternal phase, perisperm grows rapidly leading to rapid fruit expansion, whereas the endosperm, present as soon as the fertilization, is residual. Seven stages are defined to describe coffee fruit development. The maternal phase includes stages 1 and 2, defined by Salmona et al. (2008). The second phase is divided in stages 3 and 4. During the stage 3, the endosperm grows quickly at the expense of the perisperm, so that the endosperm constitutes the whole milky seed at the stage 4, whereas the rest of perisperm becomes silver skin. In fact, the end of stage 4 corresponds to the end of fruit growth. The maturation period is composed by 3 stages and the stage 5 is considered as the beginning of the maturation phase. The fruit is green and the seed has cell wall thickened due to galactomannan deposition (Wolfrom et al. 1961; Dentan 1985; Redgwell et al. 2003). Later, fruit ripening begins and the pericarp transiently turns yellow (stage 6) and red (stage 7).

In a previous study (Adler et al. 2014), stage durations have been quantitatively estimated in the environmental conditions of Saint Louis (La Réunion, France) (Table 1). In fact, fruit

development requires about 34 weeks with 17 weeks of growth (up to the stage 4). Morphological and histological impact of the mutation *laurina* has been yet studied over fruit development, but its effects on cell wall composition was still unknown and this constitutes the main objective of the current study

Period	Phases	Stages	Duration
Growth period	Maternal	1-2	Fertilization to the 10 <sup>th</sup> WAF
	Endosperm growth	3	From the 10 <sup>th</sup> to the 15 <sup>th</sup> WAF
		4	From the 15 <sup>th</sup> to the 17 <sup>th</sup> WAF
Maturation period	Green epicarp	5	From the 17 <sup>th</sup> to the 25 <sup>th</sup> WAF
	Yellow to red epicarp	6-7	From the 25 <sup>th</sup> to the 34 <sup>th</sup> WAF

Table 1. Stages defined for the fruit development (Castro et al. 2006; Salmona et al. 2008) and their corresponding average duration in weeks after flowering (WAF) at Saint Louis (La Réunion, France) (Adler et al. 2014)

Polysaccharides are major constituents of green coffee seeds and represent approximately 50% of dry weight in *C. arabica* (Clifford, 1985). In *C. arabica*, the seed at stage 7 is mainly composed of 3 types of polysaccharides: galactomannans, arabinogalactans and  $\beta$ -1,4 glucans. The galactomannans, the most abundant polysaccharide and represent at least 25% of its mass and 50% of the whole polysaccharides (Fischer et al., 2000; Oosterveld et al., 2003; Redgwell & Fisher, 2006). Galactomannans consists of a linear backbone with galactose side chains at various intervals along the mannan backbone. Galactomannans are deposited during the stage 5 in a relative short period (Redgwell et al. 2003; Joët et al. 2009) and are responsible of the secondary cell wall thickening of the endosperm cells (Fischer et al., 2000; Pettolino et al., 2001; Sutherland et al., 2004; Somerville et al., 2004). The next most abundant group of polysaccharides is the arabinogalactans which comprise up to 35% of the green seed polysaccharides (Fischer et al., 2000; Oosterveld et al., 2003). Their structure consists in a main backbone of  $\beta$ -1,3 galactose with side chains of  $\beta$ -1,6 galactose oligosaccharides. The  $\beta$ -1,6 side chains are substituted with arabinose mono- and oligosaccharide. They also contained terminal rhamnose (Nunes et al., 2008). To finish, 20% of the green seed consists of  $\beta$ -1,4

glucan (Fischer et al., 2000; Oosterveld et al., 2003). Arabinogalactans and cellulose predominate in the early stage of bean development (Fischer et al., 1999, 2000).

In the present study, B and BP seeds were compared in time-course. The first results concerned the determination of cell wall monosaccharide (CWM) and cell wall polysaccharide (CWP) composition of hemicelluloses during the development of seeds. The second part of the study deals with the highlighting of different phases of seed development and the CWM composition. Finally, investigation focused on cellulose and its strongly cross-linked CWP.

## 2. Materials and methods

### *Plant material*

Two varieties of *C. arabica* L. (B and BP) were used in this study. Seeds came from the MADOI plantation (St-Louis) at 150 m above sea level (asl) as for studies on fruit growth and histological structure (Adler et al. 2014). At this station, temperature varies between 20.9°C in October and 24.5°C in February, whereas rainfall ranges from 55 mm in October, to 117 mm in February, with a maximum in January (205 mm)<sup>1</sup>. Three couples of B and BP neighboring trees were sampled for the experiment. Flowering occurred on 15<sup>th</sup> October (2011) in both varieties. Seed harvests took place every 2 weeks from the 8<sup>th</sup> WAF to the 32<sup>nd</sup> WAF. Nonetheless, data concerning the 16<sup>th</sup> WAF in B were missing. In all sampled fruits, pericarp and parchment were removed and seeds were freeze-dried 72h and ball milled (30 vibrations/sec, 30 sec).

### *Analysis of CWM composition*

Two main steps were carried out to analyze CWM composition: 1/ hemicellulose and pectin hydrolysis using trifluoroacetic acid (TFA), and 2/ cellulose, xyloglucan and glucomannan hydrolysis using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### Hydrolysis of alcohol insoluble residue (AIR) using trifluoroacetic acid (TFA)

The powder (100 mg) was mixed with 5 mL of ethanol (96%) using a vortex, incubated in a bain-marie (80°C, 15 min), centrifuged (5000 rpm, 10 min). The pellet and the supernatant

---

<sup>1</sup> Computed from 10-year data

were split. This extraction was realized three times and supernatants were pooled for biochemical analyses. Then, to wash the pellet, 5 mL of acetone was added, samples were incubated (room temperature, 15 min), centrifuged (5000 rpm, 10 min) and the supernatant removed (twice). The AIR (remaining pellet) was dried overnight at room temperature to remove all residual traces of humidity. Three to five technical replicates (10 mg) were obtained from the AIR.

In a first step, 2.5 M TFA were added to the AIR and incubated at 100°C for 2 h leading to two fractions: the supernatant and the pellet. The supernatant was called TFA fraction and was diluted 500 times in deionized water leading to a final volume of 2 mL. On the other side, the pellet was washed with water, ethanol 96% (twice) and acetone and dried over night at room temperature.

#### Hydrolysis of residual pellet with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

In a second step, the pellet was hydrolyzed with 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (125 µL) at room temperature for 1 h to obtain the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction. 1.5 mL of deionized water was added and the solution was shaken for 2 h at 100°C. 15 µL of supernatant was diluted in 2mL of deionized water. In the second step, only seed powders from 8<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup> WAF were studied.

#### HPAEC-PAD monosaccharide analysis

Diluted TFA and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fractions were filtered (filter syringe, Anatop™, retention 0.2 µm, WHATMAN®). Monosaccharide separation was performed on a PA20 column (Dionex, Sunnyvale, CA) at a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup>. Monosaccharides were detected using a pulsed amperometric detector (gold electrode) set on waveform A according to manufacturer's instructions. A calibration curve of monosaccharide standards (Sigma-Aldrich) was run for verification of response factors. Two elution programs were necessary to analyse, on the one hand glucose, galactose, mannose and xylose contents and on the other hand arabinose and rhamnose contents because of their coelution in the first program. Four solvents were successively used: A: NaOH 50mM, B and D: Water, and C: NaOH 300mM. Table 1 gives HPAEC-PAD conditions to analyse glucose, galactose, mannose and xylose contents, while table 2 includes HPAEC-PAD conditions to analyse arabinose and rhamnose contents.

Time (min)	% A	% B	% C	% D
0	5	47.5	0	47.5
40	5	47.5	0	47.5
40.1	100	0	0	0
50	100	0	0	0
50.1	5	47.5	0	47.5
65	5	47.5	0	47.5

Table 1. HPAEC-PAD conditions to analyse glucose, galactose, mannose and xylose contents.

Time (min)	% A	% B	% C	% D
0	100	0	0	0
8	100	0	0	0
8.1	0	0	100	0
16	0	0	100	0
16.1	100	0	0	0
23	100	0	0	0

Table 2. HPAEC-PAD conditions to analyse arabinose and rhamnose contents.

### Linkage analysis

Powder samples of BP seeds harvested at the 10<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> WAF were permethylated as described by Kim and Carpita (1992). In B seeds, permethylations concerned the same harvest dates, except the 16<sup>th</sup> WAF, which was missing. Permethylated polysaccharides were then hydrolyzed, reduced and derivatised as described by Burton et al. (2000). The derivatives were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS Agilent technologies). A 25-m x 0.22-mm (i.d.) BPX 70 column (SGE Analytical Science) was used for all separations. Identification of the derivatives and deduction of the glycosidic linkages were based on both the elution order of standards and fragment ion signatures.

### *Statistical analysis*

HPAEC-PAD data were statistically analysed using Statistica 6 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Analyses included one-way and two-way ANOVA, coupled with Bonferroni's test. Hierarchical clustering using the Ward's aggregation criteria and principal component analysis (Varimax normalized) were also carried out.

### 3. Results

The study comprised three main steps: (1) the identification of CWP, deduced from permethylation analysis; (2) the emphasizing of three phases during seed development according to CWM analysis; and (3) the evidence of *laurina* mutation impact. The two first steps were carried out on BP, whereas the last step was done using the comparison between B and BP.

#### *Identification of CWP deduced from permethylation analysis*

The sugar linkage composition of seed in time course was investigated in order to study the structural characteristics of the polysaccharides present in the seed cell wall. In all samples, the TFA fraction contained six sugars, i.e. arabinose (Ara), galactose (Gal), glucose (Glu), xylose (Xyl), rhamnose (Rha) and mannose (Man), but no fucose. Permethylation analysis were carried out from the 10<sup>th</sup> to the 18<sup>th</sup> WAF, i.e. during the period of maximal growth of the seed.

Glu residues were 1,4-D-Glu and 1,4,6-D-Glu (Fig. 1). The terminal residue (*t*-Glu) was not detected, showing that its relative part in the polysaccharide chain was negligible. Lastly the branching ratio did not differ between B and BP. It nevertheless varied between weeks from 5% at the 10<sup>th</sup> WAF to 3.7% at the 18<sup>th</sup> WAF, with a peak between the 12<sup>th</sup> and the 14<sup>th</sup> WAF (about 8%). In perisperm, the polysaccharide would be starch (Geromel et al. 2006). In endosperm, where starch should not exist, it was defined as a 1,4  $\beta$ -glucan (the cellulose being only hydrolysed by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Xyl residues were 1,4-D-Xyl, 1,2,4-D-Xyl, 1,3,4-D-Xyl and *t*-Xyl, the first and the last representing about 29 and 65% of residues, respectively. Presence of 1,4-D-Xyl, 1,2,4-D-Xyl, and 1,3,4-D-Xyl suggested existence of xylans with a backbone of (1,4)-D-xylose ramified in either 1,2,4-D-xylose and/or 1,3,4-D-Xyl.

Five residues were detected for Gal, i.e. 1,6-D-Gal, 1,3,6-D-Gal, 1,4,6-D-Gal 1,3,4-D-Gal and *t*-Gal. Nevertheless, 1,6-D-Gal, 1,3,6-D-Gal and *t*-Gal represented more than 96% of residues and there was no difference between B and BP, and no change over time. The residues 1,6-D-Gal, 1,3,6-D-Gal suggested the presence of ramified galactans with a 1,6-D-Gal backbone. The 1,3,6-D-Gal ramification rate (1,3,6-D-Gal/ $\Sigma$   $\square$ residues) increased from 31 to 59% over time.

Ara also showed five types of residues, i.e. 1,2-D-Ara (1%), 1,3-D-Ara (3%), 1,5-D-Ara (38%), 1,2,5-D-Ara (11%) and *t*-Ara (47%). The interpretation of Ara residues is more complex due to the fact that arabinose has been found in several polysaccharides: arabinans, arabinogalactans type I, arabinogalactans type II and arabinoxylans. Concerning arabinans, this would include 1,5-D-Ara and 1,2,5-D-Ara. Their ramification rate was about 20% on average.

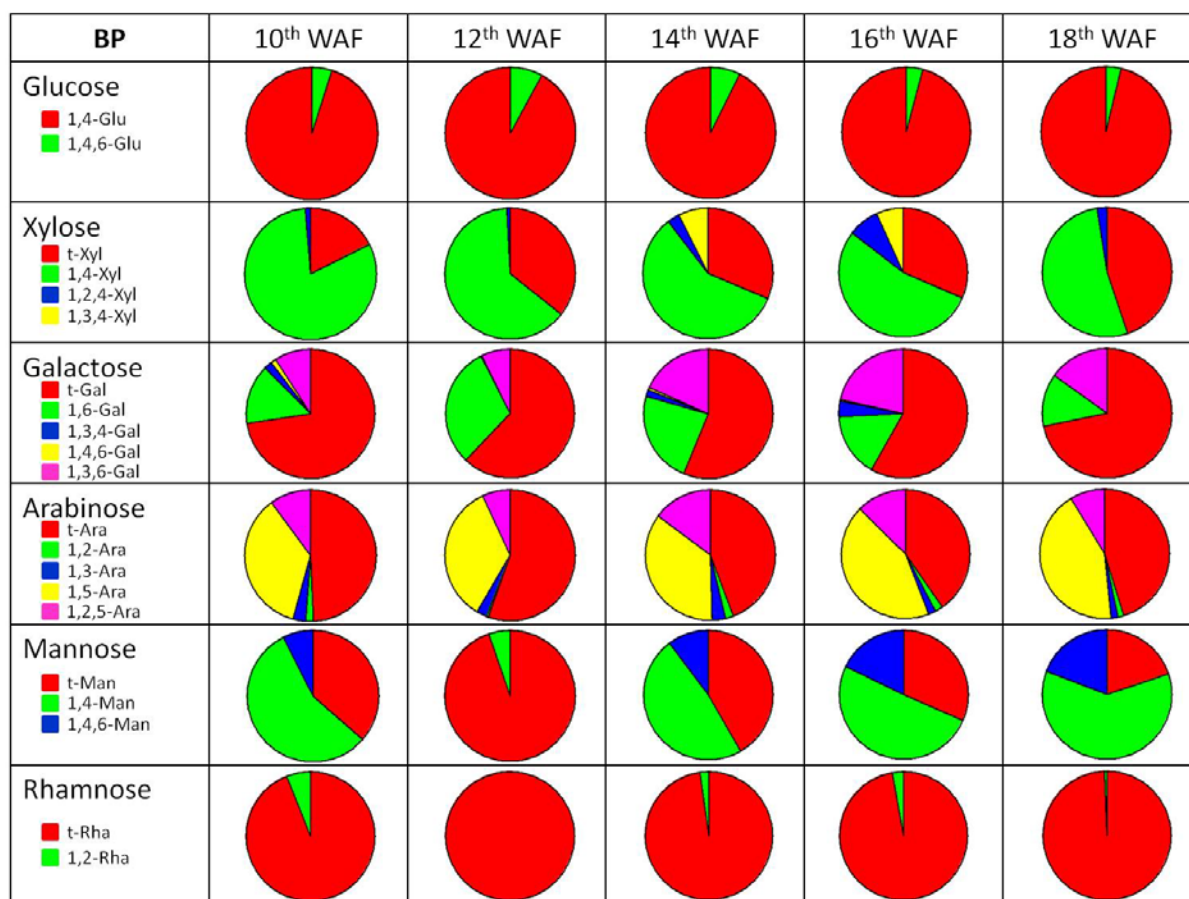


Figure 1: Relative percentage of each linkage type for Glu, Xyl, Gal, Ara, Man and Rha in BP seeds at 10<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> WAF.

Man residues were 1,4-D-Man (50%), 1,4,6-D-Man (10%) and *t*-Man (40%). The 1,4-D-Man and 1,4,6-D-Man would imply the presence of mannans with a weakly ramified (14%) backbone of 1,4-D-mannose. These mannans could be in fact galactomannans, known in coffee seeds. The ratio (1,4,6)-Man:(1,4)-Man was about 1:5.



Lastly, Rha residues only included 1,2-D-Rha (2%), and *t*-Rha (98%). Rhamnans would only consist in a 1,2-D-Rha backbone without ramification. In fact, rhamnose would be included in rhamnogalacturonan and/or rhamnoarabinosyl, a side chain of the arabinogalactans.

For summarizing, when taking in account the whole of permethylation results, xylans would be more precisely arabinoxylans, where side chains would include 1,2-D-Ara, 1,3-D-Ara and *t*-Ara. Similarly, galactans would be arabinogalactans type II, where side chains would include 1,3-D-Ara and *t*-Ara. Consequently, most CWP of seeds would be arabinogalactans, arabinoxylans, galactomannans and arabinans.

#### *Emphasizing of three phases during seed development according to CWM analysis*

Monosaccharide content of the TFA fraction decreased from 77.6% (8<sup>th</sup> WAF) to 38.7% dry matter basis (dmb) (32<sup>nd</sup> WAF). The difference with 100% would be due to lipids and proteins present in the powder. Each monosaccharide contents showed a specific behavior over time (Fig. 2A and 2B).

Starch, which cannot be considered as CWM, is present in perisperm and absent of endosperm. In our study, the relative Glu content decreased from the 8<sup>th</sup> WAF and the process speeded up between the 12<sup>th</sup> and the 15<sup>th</sup> WAF, when perisperm disappeared and endosperm grew (Fig. 2A). This would correspond to the starch hydrolysis. Beyond the 16<sup>th</sup> WAF, relative Glu content reached an asymptote at 7% of relative monosaccharide content (Fig. 2A). In the case, Glu would rise from  $\beta$ -1,4 glucan hydrolysis as deduced from permethylation experiments. Glu could be considered as marker of the relative importance of endosperm in the seed using  $y = (x - \text{Glu}_{\min}) / (\text{Glu}_{\max} - \text{Glu}_{\min})$ , where  $x$  is the relative Glu level at a given date,  $\text{Glu}_{\max}$  and  $\text{Glu}_{\min}$  are the relative Glu levels at the 8<sup>th</sup> and 32<sup>th</sup> WAF, respectively, i.e. 65% and 7%. According to the formula, the relative importance of endosperm would be 12%, 86%, 89% and 100% at the end of stages 2, 3, 4 and 5, respectively.

In the next step of the analysis, Glu was consequently removed and the relative Man, Xyl, Gal and Ara contents were then estimated, leading to the figure 2B.

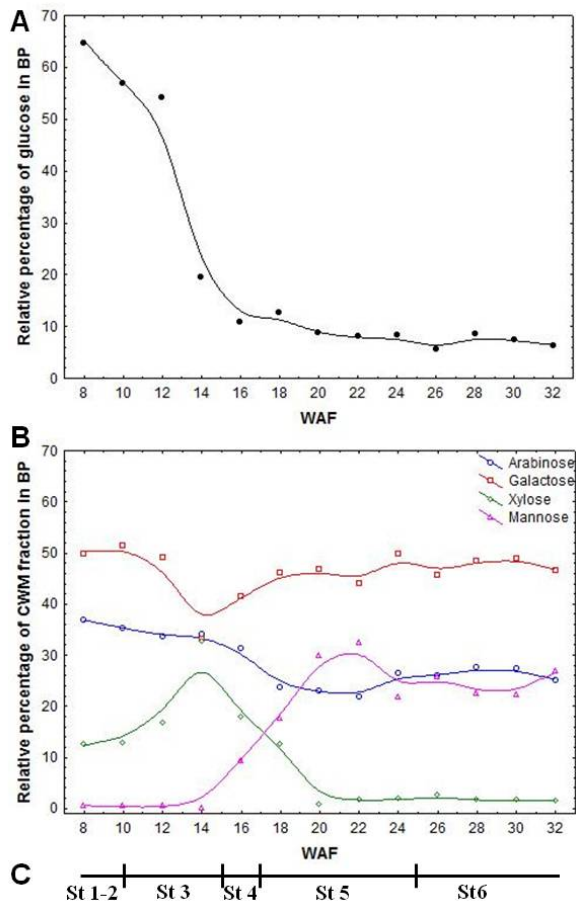


Figure 2: Time-course of relative percentage of (A) glucose and (B) arabinose, galactose, xylose and mannose in TFA fraction from the 8<sup>th</sup> to the 32<sup>nd</sup> WAF in BP. (C) represented the development stages in time-course in B and BP seeds (Adapted from Adler et al., 2014)

### Monosaccharide composition of cell wall polysaccharides (CWP) over time in the TFA fraction

The hierarchical clustering showed two groups of weeks (Fig. 3). The first group comprised the 8<sup>th</sup> to the 18<sup>th</sup> WAF, during which, CWM composition strongly varied and two sub-groups can be observed: from the 8<sup>th</sup> to the 12<sup>th</sup> WAF, on the one hand and from the 14<sup>th</sup> to the 18<sup>th</sup> WAF on the other hand. The second group of the hierarchical clustering included the 20<sup>th</sup> to the 32<sup>nd</sup> WAF.

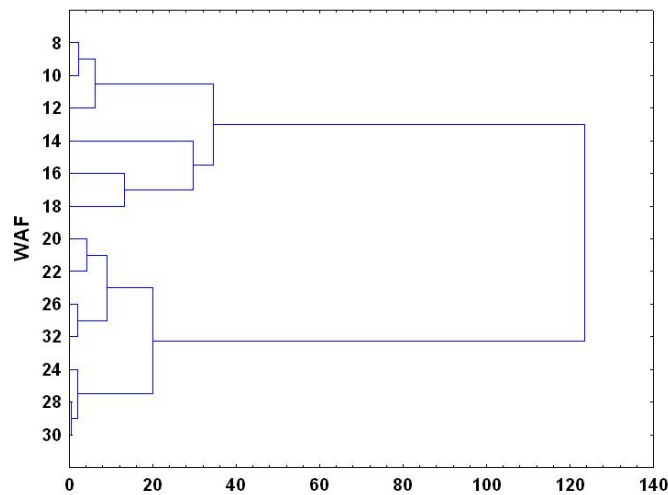


Figure 3. Hierarchical clustering showing two main groups of weeks according to the CWM composition over time in BP

From these results, two key dates can be emphasized – the 14<sup>th</sup> and the 20<sup>th</sup> WAF – leading to take in account 3 phases: 1/ from the 8<sup>th</sup> to the 14<sup>th</sup> WAF ( $\phi$  1), 2/ from the 14<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> WAF ( $\phi$  2), and 3/ from the 20<sup>th</sup> to the 32<sup>nd</sup> WAF ( $\phi$  3).

#### Arabinose, galactose and xylose contents in the TFA fraction during the $\phi$ 1

The phase  $\phi$  1 was characterized by the quasi-absence of Man in both varieties reflecting the absence of galactomannans. Only one principal component explained all variation in CWM composition, opposing the 8<sup>th</sup> to the 14<sup>th</sup> WAF. This component was highly correlated to the relative content of Xyl ( $r = -0.991$ ), Gal ( $r = 0.962$ ), and Ara ( $r = 0.656$ ). During this phase, the relative Xyl content increased from 12.6 to 32.7 % of total CWM, the 14<sup>th</sup> WAF constituting its maximum. At the opposite, the relative Gal and Ara contents decreased from 49.9% to 33.2% and from 36.8% to 34.1%, respectively. The simultaneous decreasing of Gal and Ara would rise from the hydrolysis of arabinogalactans by TFA, this polysaccharide being the only one galactan present before the occurrence of galactomannans (Fisher et al. 2000). According to permethylation analysis, Xyl would rise from the hydrolysis of arabinoxylans. In fact, the principal component summarized a trade-off between arabinoxylans and arabinogalactans (Fig. 4): during  $\phi$  1, arabinoxylan rate increased at the expense of arabinogalactans.

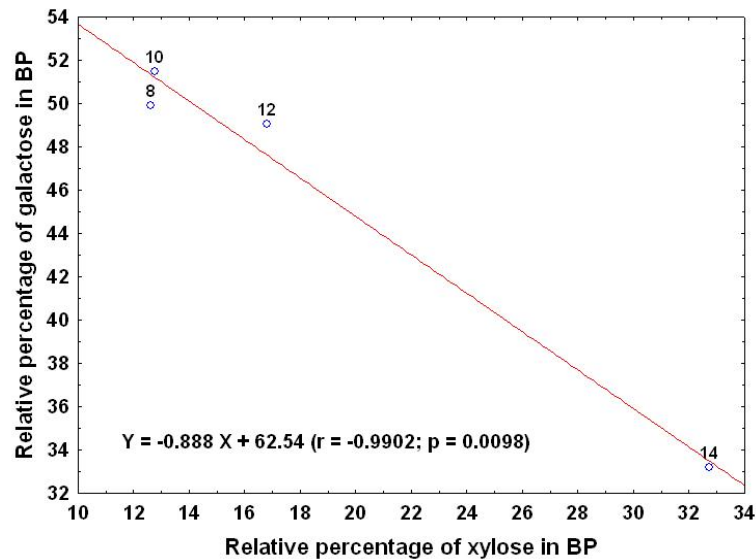


Figure 4: Relation between relative xylose and galactose contents during the phase  $\phi$  1 (expressed in % of CWM)

#### Changes over time of arabinose, galactose, xylose and mannose contents in the TFA fraction during the $\phi$ 2

The phase  $\phi$  2 was characterized by the strong increase from 0% to 29.8 % of relative Man content. The occurrence of Man corresponded to the transition between the stages 3 and 4 and would rise from galactomannan hydrolysis by TFA. Only one principal component explained all variation in CWM composition opposing the 14<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> WAF. This component was negatively correlated to the relative contents of Ara ( $r = -0.966$ ) and Xyl ( $r = -0.983$ ) and positively correlated to the relative contents of Man ( $r = 0.981$ ) and Gal ( $r = 0.969$ ). In fact, the 4 monosaccharides can be sorted in two groups - Ara and Gal on the one hand, Xyl and Man on the other hand - according the intensity of changes over time. In the first case, such changes were moderate and the relative Gal content increased from 33.2 to 46.7% of CWM, while the relative Ara content decreased from 34.1 to 22.9%. By contrast, they were strong in the case of Xyl and Man: relative Xyl content decreased from 32.7 to 0.7%, while relative Man content increased from 0 to 29.8%. As Xyl would rise from the hydrolysis of arabinoxylan by TFA, this polysaccharide can be considered as residual at the 20<sup>th</sup> WAF. A trade-off existed between relative Man and Xyl contents (Fig. 5). For summarizing, the phase  $\phi$  2 would be mainly characterized by the strong increase of galactomannans and the drop of arabinoxylans.

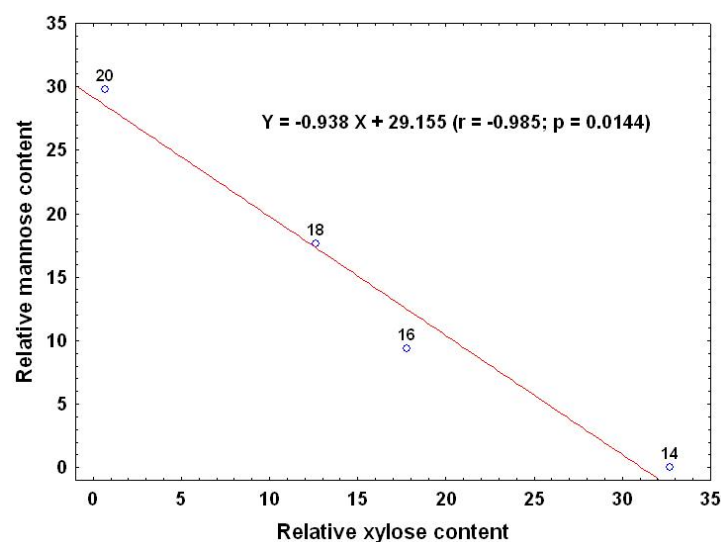


Figure 5. Trade-off between mannose and xylose from the 14<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> WAF

### Changes over time of arabinose, galactose, xylose and mannose contents in the TFA fraction during the $\phi$ 3

The principal characteristic of the  $\phi$  3 was the stabilization of CWM contents (Fig. 2B). The relative Gal, Man, Ara and Xyl contents reached an asymptote at about 43.9%, 32.5%, 21.8% and 1.78% of relative CWM content. Man and a part of Gal would rise from the hydrolysis of galactomannans by TFA, while and the other part of Gal rose from arabinogalactans. The Xyl being residual, the Ara present in the TFA fraction would rise from the hydrolysis of arabinogalactans and arabinans. During this stage, only galactomannans, arabinans, arabinogalactans and few arabinoxylans would be present in cell wall hemicelluloses.

### Monosaccharide composition of seed polysaccharides in the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction

CWM content of the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction represented a minor part of CWP presents in the seed, increasing linearly only from 0.67% and 1.54% of dmb at the 8<sup>th</sup> and the 22<sup>nd</sup> WAF, respectively (Fig. 6). Monosaccharides of this fraction were glucose, xylose and mannose, the glucose being large majority from the 8<sup>th</sup> to the 18<sup>th</sup> WAF. A small peak of xylose was observed at the 14<sup>th</sup> WAF, whereas the mannose content strongly increased from the 20<sup>th</sup> WAF. Notably, there was no difference between B and BP ( $p = 0.90$ ). These monosaccharides would rise from hydrolysis of xyloglucans, glucomannans and cellulose, the three polysaccharides being cross-linked in the cell wall (McCann et al., 1990; McCann & Roberts, 1992; Carpita & Gibeaut, 1993; Atalla et al., 1993; Whitney et al., 1998). So the peak of xylose at the 14<sup>th</sup> WAF was transient and would rise from xyloglucans. From the 20<sup>th</sup> WAF,

there would be remobilization of cellulose to synthesize glucomannans (Fig. 7) explaining the trade-off.

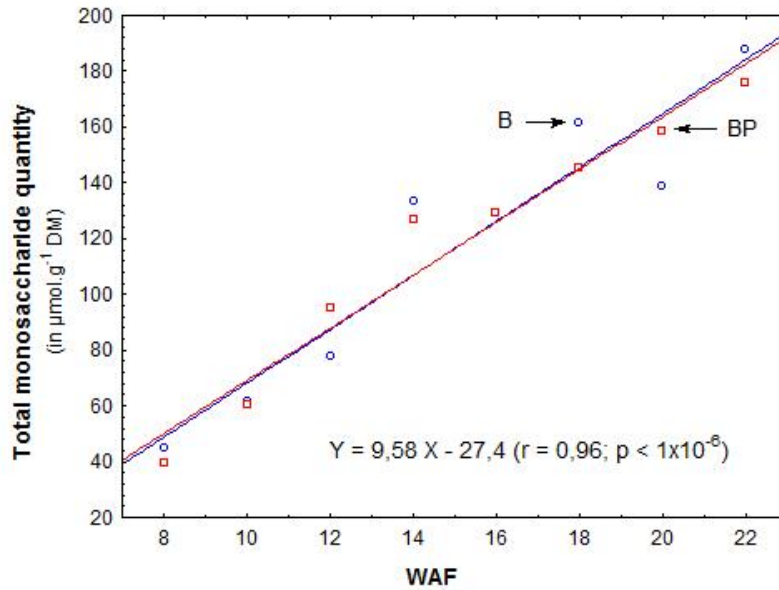


Figure 6: Total monosaccharide quantity (in  $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ dmb}$ ) of the  $\text{H}_2\text{SO}_4$  fraction in B and BP seeds from the 8<sup>th</sup> to the 22<sup>nd</sup> WAF.

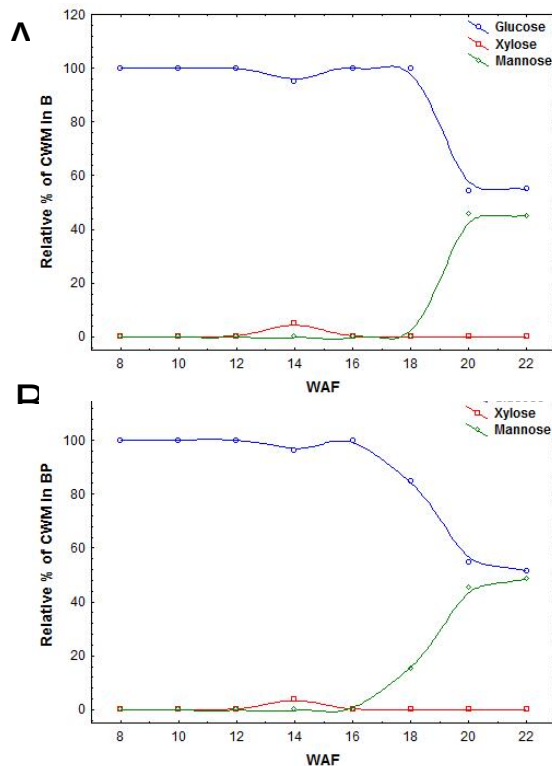


Figure 7: Relative percentage of glucose, xylose and mannose content (mole of dmb) in the  $\text{H}_2\text{SO}_4$  fraction (A) in B and (B) in BP

*Impacts of the laurina mutation on cell wall composition in mono- and polysaccharides*

On a general point of view, there was no difference between B and BP for the ramification rates of identified polysaccharides.

During the phase  $\phi$  1, the *laurina* mutation had an effect on CWM. At the 8<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> WAF, there was significantly more Ara and less Gal in B than in BP, while Xyl content did not change between varieties (Table 3). This underlined a difference in arabinogalactan content and/or structure between B and BP. From the 12<sup>th</sup> WAF, the trade-off over time between arabinogalactans and arabinoxylans was stronger in B with a ratio Xyl/Gal reaching 1.98 at the 14<sup>th</sup> WAF in B vs 0.98 in BP.

WAF	Arabinose		Galactose		Xylose		Mannose	
	B	BP	B	BP	B	BP	B	BP
8	<b>44.1</b>	<b>36.8</b>	<b>45.8</b>	<b>49.9</b>	10.1	12.6	0.0	0.6
10	<b>40.2</b>	<b>35.2</b>	<b>45.4</b>	<b>51.5</b>	13.3	12.8	1.1	0.6
12	32.6	33.6	<b>40.8</b>	<b>49.0</b>	<b>26.2</b>	<b>16.8</b>	0.4	0.5
14	<b>26.5</b>	<b>34.1</b>	<b>25.9</b>	<b>33.2</b>	<b>47.6</b>	<b>32.7</b>	0.0 <sup>a</sup>	0.0

Table 3. ANOVA analyses on the relative percentage of CWM during the  $\phi$  1. Bold indicated cases for which B was significantly different from BP.

During the phase  $\phi$  2, it can be observed that differences of relative contents between B and BP existed for Ara, Gal and Xyl at the 14<sup>th</sup> WAF, but vanished at the 20<sup>th</sup> WAF (Table 4). The end of the  $\phi$  2 was characterized by no difference in CWM content between B and BP.

WAF	Arabinose		Galactose		Xylose		Mannose	
	B	BP	B	BP	B	BP	B	BP
14	<b>26.5</b>	<b>34.1</b>	<b>25.9</b>	<b>33.2</b>	<b>47.6</b>	<b>32.7</b>	0.0	0.0
16	-	31.3	-	41.6	-	17.8	-	9.4
18	26.9	23.6	<b>38.9</b>	<b>46.2</b>	<b>21.6</b>	<b>12.6</b>	12.6	17.6
20	20.4	22.9	47.7	46.7	0.9	0.7	31.0	29.8

Table 4. ANOVA analyses on the relative percentage of CWM during the  $\phi$  2. Bold indicated cases for which B was significantly different from BP. Data were missing for the 16<sup>th</sup> WAF in B.

Lastly, the comparison between B and BP did not show difference between varieties during the phase  $\phi$  3 (Table 5).

For summarizing, the mutation *laurina* had its effect through the maternal tissues, i.e. the perisperm. The development of endosperm at the expense of perisperm led to completely vanish the impact of the mutation.

WAF	Arabinose		Galactose		Xylose		Mannose	
	B	BP	B	BP	B	BP	B	BP
20	20.4	22.9	47.7	46.7	0.9	0.7	31.0	29.8
22	21.0	21.8	44.4	43.9	1.4	1.8	33.2	32.5
24	26.1	26.5	-	49.8	4.4	1.9	-	21.7
26	24.6	26.0	45.6	45.7	2.2	2.6	27.5	25.7
28	27.0	27.5	46.1	48.4	1.7	1.7	25.2	22.4
30	26.2	27.3	48.4	48.9	2.0	1.6	23.4	22.3
32	25.5	25.0	44.4	46.6	2.0	1.5	28.2	26.9

Table 5. ANOVA analyses on the relative percentage of CWM during the  $\phi$  3. There was no difference between B and BP.

#### 4. Discussion

The aim of the present work was to characterize the CWM and CWP during the development of the B and BP seeds using the HPAEC-PAD and permethylation analyses. These approaches provides new data as 1/the determination of CWP composition during the development of the seed and the highlighting of three development phases; 2/ the connection between the evolution of the seed morphology and its CWP composition; and 3/ the impact of the mutation on the CWP in time course.

##### *Identification of CWP and their evolution in time-course*

During the fruit development, several CWP were identified in the TFA fraction (galactomannans, arabinogalactans, arabinoxylans and arabinans) and in the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction (cellulose, xyloglucans and glucomannans).

Arabinogalactans, mannans (and/or galactomannans) mainly compose the coffee seed at the mature stage (Wolfrom et al. 1960, 1961; Wolfrom & Patin, 1964, 1965; Thaller & Arneth, 1968; Shadaksharaswamy & Ramachandra 1968; Bradbury & Halliday, 1990; Nunes & Coimbra 2001).

By contrast, this was the first time that arabinoxylans were identified in coffee seeds. This is due to the fact that most studies have concerned mature seeds (Stage 7). Even in the case of Fisher et al.'s analyses (1999), results did not include the 12<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> WAF, where Xyl peak was at its maximum. Nonetheless, the presence of arabinoxylans in CWP is known in other organs of coffee trees. This is the case in leaves (Cecy & Correa, 1984; Lima et al., 2013), as well as in cotyledons, hypocotyls and roots of seedlings (Adler et al. submitted).



Concerning xyloglucans, several studies identified this compound in small amount in green coffee seed (Kacurakova et al., 2000; Oosterveld et al. 2003; Lima et al., 2013). To finish, our study underlined the putative presence of glucomannan. To date, the presence of such polysaccharide is not known in the coffee seed, but has been emphasized in seeds of konjac (Gao & Nishinari, 2004) or *Scilla nonscripta* (Jacobsen, 1984). To finish, it can be mentioned the identification of galactoglucomannans in the green coffee seed by Oosterveld (2004). Nevertheless, galactose was not detected in our H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction.

When taking in account CWP evolution in seed time-course, three phases occurred: the  $\phi$  1 from the 8<sup>th</sup> to the 14<sup>th</sup> WAF, the  $\phi$  2 from the 14<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> WAF and the  $\phi$  3 from the 20<sup>th</sup> to the 32<sup>nd</sup> WAF. The first phase would be characterized by the predominance of arabinogalactans, as demonstrated by Fischer et al. (1999), but also by arabinoxylans and arabinans, as shown in our study. The second phase is mainly characterized by the increased importance of highly branched galactomannans (Redgwell et al. 2003), at the expense of arabinoxylans. Lastly, galactomannans constituted the main CWP present in the third phase, associated with arabinogalactans and arabinans. Such result has been already observed by Redgwell et al. (2003). It can be highlighted that arabinoxylans were residuals beyond the 22<sup>th</sup> WAF.

#### *Relation between morphological development and CWP composition in BP seeds*

During growth and development of the coffee seed, the morphology, the histology and the cell wall composition in polysaccharides changed markedly. Differences in fruit morphology lead to split the fruit development into two main phases with 7 stages. Nevertheless, the study of CWM permitted to divide the seed development into 3 phases.

The first phase ended at the 14<sup>th</sup> WAF in the study. This 14<sup>th</sup> WAF was characterized by a peak of Xyl and, especially was the last week without Man. At the next harvest date (16<sup>th</sup> WAF), Man was present, while Xyl level decreased. In fact the end of  $\phi$  1 would be between the two harvest dates, i.e. approximately at the 15<sup>th</sup> WAF. This corresponds to the end of the stage 3, as defined from the previous study on morphological and histological fruit development over time (Adler et al. 2014) in the environmental conditions at the MADOI plantation (Fig. 2C). At the end of  $\phi$  1, 95% of fruit growth happened (Adler et al. 2014).

In fact,  $\phi$  1 would correspond to the endosperm development. This tissue, clearly visible as soon as the 12<sup>th</sup> WAF (Vishveshwara and Chinnappa 1965), replaces the perisperm in the

locule, constituting about 86% of the seed at the  $\phi$  1 end (estimation done using Glu as marker). As only one principal component explained CWM variations during  $\phi$  1, this component would represent the impact of the substitution of perisperm by endosperm on CWM and CWP composition. In other terms, cell wall of endosperm would be rich in arabinoxylans. In the conditions, the trade-off, we observed between arabinogalactans and arabinoxylans, would also result from the evolution over time of the rate endosperm/perisperm. So, predominance of arabinogalactans in the seed until the 12<sup>th</sup> WAF (Fischer et al., 1999) could reflect the predominance of perisperm. In conclusion, the trade-off galactans-xylans would characterize the  $\phi$  1 and would be a clue to determine the age of the seed. This also lead to be questioned on the biological role of arabinoxylans in endosperm cell wall in regards to the perisperm.

The end of the second phase happened at the 20<sup>th</sup> WAF. In fact,  $\phi$  2 overlaid the stage 4 and the first half of the stage 5 (Fig. 2C). During  $\phi$  2, endosperm becomes milky and then hard due to the presence of galactomannans deposition (Wolf from et al. 1961; Dentan 1985; Redgwell et al. 2003). In our environmental conditions, mannans would only occur after the 15<sup>th</sup> WAF, meaning that galactomannans would not exist before this date. The increase of Man level and the remobilization of galactose (trade-off between mannose and xylose) allowed defining stage 4 as the beginning of galactomannan biosynthesis. The soft aspect of the milky endosperm at this stage would be due to the highly substituted galactomannans (Redgwell et al., 2003). From the stage 5 (17<sup>th</sup> WAF), the endosperm becomes harder and harder, but the CWP composition would not change beyond the second phase. For summarizing,  $\phi$  2 would be a transient step when cell division ended and CWP storage happened.

Lastly, the third phase included the second half of the stage 5, the stage 6, and probably the stage 7. Beyond the 20<sup>th</sup> WAF the endosperm of B and BP is hard and its cell walls are thick (Adler et al., 2014). According to Redgwell et al. (2003), the galactomannans were less substituted and constitute the main CWP of the seed. The present study confirmed the predominance of these CWP.

*Impact of the laurina mutation on CWP composition in time course*

There is no structural difference in the endosperm of B and BP (cell wall thickness, cell size) beyond the 20<sup>th</sup> WAF (Adler et al., 2014). The present study also showed no varietal difference in CWP composition in  $\phi$  3. For summarizing, as soon as the growth was completely ended in both varieties, the mutation *laurina* does not modify the CWP composition in seeds.

By contrast,  $\phi$  1 and  $\phi$  2 showed changes of CWP composition variation due to the mutation, and strongly suggest a relationship with the seed growth. It can be mentioned the delayed fruit growth (one week) observed in BP, mainly during the stage 3 (Adler et al. 2014). Such delay could impact de endosperm/perisperm ratio. With such hypothesis, the replacement of perisperm by endosperm could be delayed in BP. The ratio BP/B increased for Ara and Gal, but decreased for Xyl, from the 8<sup>th</sup> to the 14<sup>th</sup> WAF, i.e.  $\phi$  1, suggesting a lowering in BP of the perisperm replacement. In conclusion, differences of CWP composition between B and BP could indirectly depends on the growth differences over time, and would disappeared at the end of  $\phi$  2 when growth was ended in both varieties.

## Article 3 : Evolution of seed caffeine and chlorogenic acid contents over development in *Coffea arabica* ‘Laurina’.

Authors: Adler S, Palama T, Fock-Bastide I, Noirot M.

### 1. Introduction

*Coffea arabica* ‘Laurina’, also named ‘Bourbon pointu’ (BP), is a natural mutant of the ‘Bourbon’ (B) variety. The mutation *laurina* is monolocus, Mendelian, and recessive (Krug, 1949; Krug & Carvalho, 1951; Krug et al., 1954), but is also characterized by pleiotropic effects (Chevalier, 1947). The effects of the mutation also concerns seeds which have lower caffeine content (CAF): 0.61-0.70% dry matter basis (dmb) (Tango & Carvalho, 1963; Charrier & Berthaud, 1975; Mazzafera & Magalhaes, 1991; Baumann et al., 1998).

In seeds of African coffee species, CAF varies from trace of caffeine (<0.01% (dmb) as in *C. pseudozanguebariae* (PSE)) to 2.5% in *C. canephora* (Charrier & Berthaud, 1975; Anthony et al., 1993; Mazzafera et al., 1997; Ky et al., 2001; Campa et al., 2005).

Concerning chlorogenic acid content (CQA), the values described in green coffee beans, may vary from 1% dmb in *C. humblotiana*, to 4 to 8.4% dmb for *C. arabica*, and finally from 7 to 14.4% dmb for *C. canephora* (Clifford & Jarvis, 1988; Clifford et al., 1989; Rakotomalala et al., 1993 Campa et al., 2005). A low CQA content (1.2 % dmb) was found in *C. pseudozanguebariae* seeds, a caffeine-free species (Clifford & Ramirez-Martinez, 1991). Such low content has been also observed in some other low-caffeine or caffeine-free species from Africa as *C. salvatrix* and *C. humblotiana* (Campa et al., 2005; Clifford, 1985). Several species show similar CQA, but different CAF. This is the case for example in *C. eugenoides* (CQA = 5.17% dmb) and *C. racemosa* (CQA = 5.33% dmb), showing CAF = 0.51% and 1.05% dmb, respectively (Campa et al., 2005). Similar CQA and different CAF also exist within *C. arabica*. The best example is given by BP, for which CQA = 3.58% dmb (Campa et al., 2012), i.e. close to 3.26% dmb observed on average in other varieties (Ky et al., 2001), but showing twice less CAF.

CAF forms a complex with CQA (Payen, 1846), known as chlorogenate of caffeine, in a 1:1 molecular ratio (Sondheimer et al., 1961). The complex would explain the positive correlation observed between CQA and CAF within the subgenus *Coffea* (Anthony et al., 1993). When

taking in example BP, the CAF/CQA ratio decreases sharply compared to B. In fact, only a part of chlorogenic acids are bound with caffeine. Smith (1963) underlined the about 26% of ACG are complex with CAF in *C. arabica* and 35% in *C. canephora*.

Growth and maturation constitutes the two main key periods of the fruit development (Castro et al. 2006). The growth period is split into the maternal phase and the endosperm development phase. During the maternal phase, perisperm grows rapidly leading to rapid fruit expansion, whereas the endosperm, present as soon as the fertilization, is residual. The maternal phase includes stages 1 and 2, defined by Salmona et al.(2008). The second phase is divided in stages 3 and 4. During the stage 3, the endosperm grows quickly at the expense of the perisperm. At the stage 4, the whole milky seed is constituted by endosperm, the rest of perisperm being the silver skin. The end of stage 4 corresponds to the end of fruit growth. The maturation period is composed by 3 stages and the stage 5 is considered as the beginning of the maturation phase. The fruit is green and the seed has cell wall thickened due to galactomannan deposition (Wolfrom et al., 1961; Dentan, 1985; Redgwell et al., 2003). Then, fruit ripening begins and the pericarp transiently turns yellow (stage 6) and red (stage 7).

In a previous study (Adler et al. 2014), stages durations have been quantitatively estimated in the environmental conditions of Saint Louis (la Réunion, France) (Table 1). Fruit development requires about 34 weeks with 17 weeks of growth (up to the stage 4). Morphological and histological impact of the mutation *laurina* has been yet studied over fruit development. Nevertheless, precise accumulation of CAF and CQA content in BP during the growth and the development of seeds were not already and this constitutes the main objective of the current study.

Period	Phases	Stages	Duration
Growth period	Maternal	1-2	Fertilization to the 10 <sup>th</sup> WAF
	Endosperm growth	3	From the 10 <sup>th</sup> to the 15 <sup>th</sup> WAF
		4	From the 15 <sup>th</sup> to the 17 <sup>th</sup> WAF
Maturation period	Green epicarp	5	From the 17 <sup>th</sup> to the 25 <sup>th</sup> WAF
	Yellow to red epicarp	6-7	From the 25 <sup>th</sup> to the 34 <sup>th</sup> WAF

Table 1. Stages defined for the fruit development (De Castro & Marraccini, 2006; Salmona et al., 2008) and corresponding average duration in weeks after flowering (WAF) at Saint Louis (La Réunion, France) (Adler et al., 2014)

## 2. Material and method

### *Plant material*

Two varieties of *C. arabica* L. (B and BP) were used in this study. Seeds of B and BP were used in the study. Plant material came from the MADOI plantation (St-Louis) at 150 m above sea level (asl) for studies on fruit growth and histological structure. At this station, temperature varies between 20.9°C in October and 24.5°C in February, whereas rainfall ranges from 55 mm in October, to 117 mm in February, with a maximum in January (205 mm)<sup>2</sup>. Three couples of B and BP neighboring trees were sampled for the experiment. Flowering occurred on 15th October (2011) in both varieties. Fruit harvests took place every 2 weeks from the 4<sup>th</sup> WAF to the 32<sup>nd</sup> WAF. In the study, seeds were then freeze-dried 72h and used for experiments.

### *Caffeine and chlorogenic acid extraction and dosage*

The pericarp of seeds was removed and seeds were crushed in a ball mill (5 min). The crushing yielded a fine powder. The powder (100 mg) was mixed with 5 mL of ethanol (96%) using a vortex, incubated in a bain-marie (80°C, 15 min) and centrifuged (5000 rpm, 10 min). After centrifugation, the supernatant was collected. This extraction was realized 3 times and supernatants were pooled. Three technical repetitions were realized.

The supernatant was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), coupled to a UV spectrophotometer. The elution program used two solvents, A and B. Solution A was 0.1% of acetic acid in 95% of millipored water and 5% of methanol. The solution B was 0.1% of acetic acid in 5% of millipored water and 95% of methanol. These two phases were degassed and sonicated before use. Sample and standard were analyzed at room temperature using the following program: 0 min, A-B mixture (75/25); 0-20 min, B from 25% to 52% of linear gradient; 20-22min, B from 52% to 100%. Flow rate was 0.8 mL/min in a LiChroCART ® 250-4 column (Merk KGaA, Germany). The analysis was performed on 20µL of each sample and four technical repetitions were realized. UV detection was carried out at a wavelength of 272 nm and 327 nm, corresponding to the caffeine and CQA maximum absorption, respectively.

---

<sup>2</sup> Computed from 10-year data

### 3. Results

#### *Preliminary results on CAF and CQA content in BP seed in time course*

The accumulation of CAF and CQA content (Fig. 1A and 2A respectively) during growth and development of coffee seeds was studied. Figure 1A showed that CAF content increased from 0.34% at the 8<sup>th</sup> to 0.61% at the 32<sup>nd</sup> WAF, but not linearly. CAF content decreased until the 12<sup>th</sup> WAF and then was followed by three peaks. The first one happened at the 16<sup>th</sup> WAF (stage 4) to reach 0.67% dmb. The second one was about 0.86% dmb at the 24<sup>th</sup> WAF (end of stage 5). Finally, the last increase happened at the 28<sup>th</sup> WAF (0.76% dmb) (during the stage 6) before the decrease to 0.61% dmb which was characteristic of the BP CAF content.

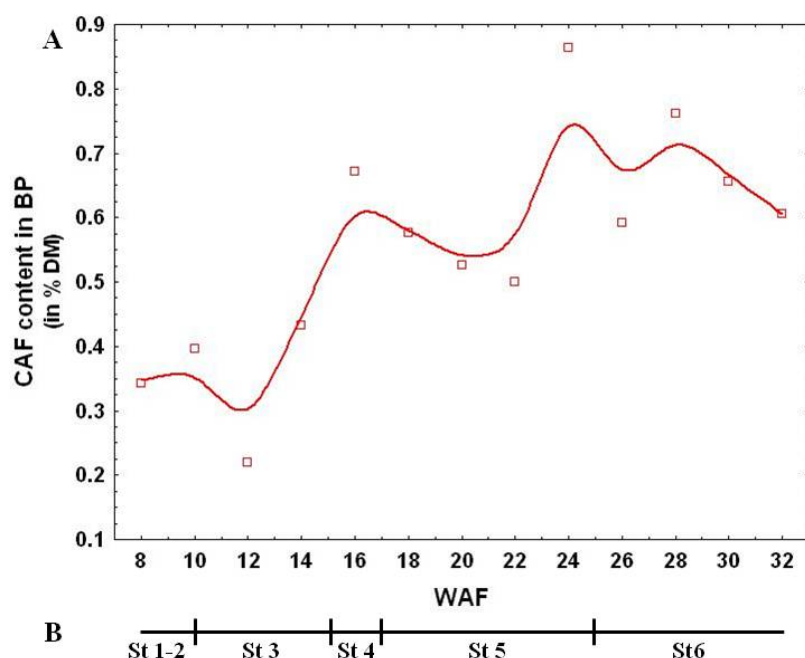


Figure 1: (A) Time-course of CAF content (in % dry mass) in BP. (B) represented the development stages in time-course in BP seeds (Adapted from Adler et al., 2014)

CQA content already represented 1.3% dmb on average between the 8<sup>th</sup> and the 10<sup>th</sup> WAF (Fig. 2). The decrease at the 12<sup>th</sup> WAF was followed strong increase during the stage 3. This period was also the transition between the maternal phase (with developing perisperm) and the endosperm development (where the endosperm replaces perisperm). At the 16<sup>th</sup> WAF (stage4), a peak reached 3.7% dmb of CQA content. Then, the CQA content in BP was slightly constant until the 32<sup>nd</sup> WAF at about 0.95% dmb.

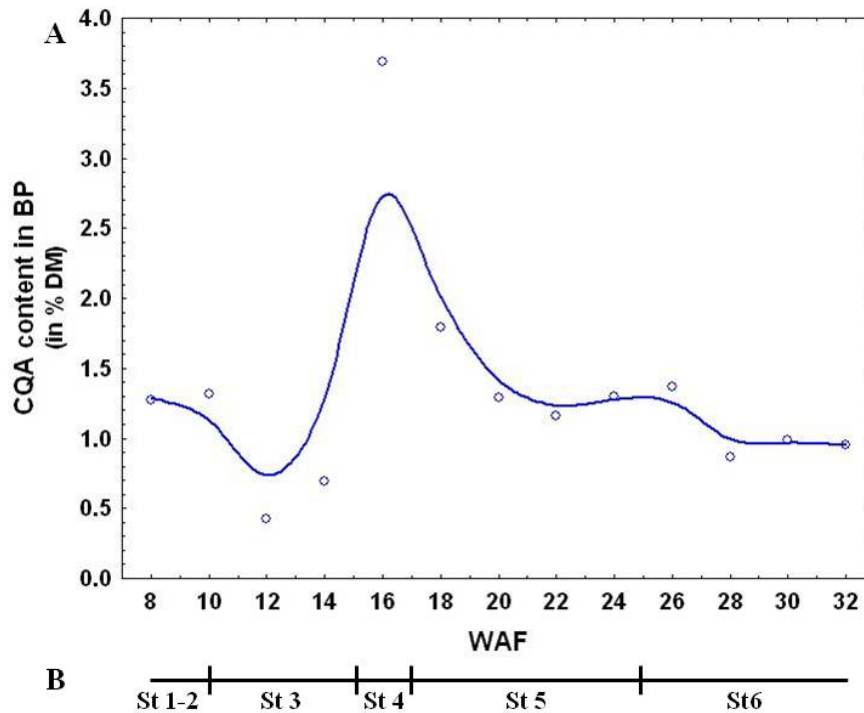


Figure 2: (A) Time-course of CQA content (in % dry mass) in BP. (B) represented the development stages in time-course in BP seeds (Adapted from (Adler et al., 2014))

#### 4. Perspectives

##### *Optimization of the CQA and CAF extraction from coffee seed*

The evolution of CQA content in BP seed observed in this work was not expected. Indeed, this usually follows a sigmoid model with a strong increase between the stages 3 and 5 (Clifford & Kazi, 1987; Joët et al., 2009). This difference would be due to a change in the extractability of CQA. During the development of the seed the CQA is first vacuolar, then migrate to the space between cell membrane and cell wall (Dentan, 1985). This difference of location and storage could influence the extraction yield. Ky et al. (2001) used a mix of methanol:water (70:30). To totally extract CQA from the seed whatever the developmental stage, the understanding of the storage and the trap of CAF to CQA, and especially the cell wall structure, would be essential.



## Chapitre III : Caractérisation des plantules de Bourbon et Bourbon Pointu

L'effet de la mutation *laurina* a été étudié sur les plantules et la comparaison avec des plantules de B a été réalisée sur plusieurs aspects : 1/ au niveau morphologique, histologique et structural, 2/ au niveau biochimique et plus exactement sur la composition pariétale en mono- et polysaccharides ainsi que sur les teneurs en caféine et en acide chlorogénique.

Ces deux niveaux d'étude ont donné lieu à deux projets de publications dont un en soumission et un en cours de préparation :

(1) **Adler S, Verdeil JL, Conéjéro G, Fock-Bastide I, Zaharia LI, Sarrazin A, Hoareau J, Noirot M (2014).** Daylight is directly implied in the expression of the *laurina* mutation in *Coffea arabica* L. Impact on semi-dwarfism, cell number and hormonal profiles in hypocotyls, soumis, Plant Physiology and Biochemistry.

(2) **Adler S, Mouille G, Fock-Bastide I, Palama T, Citerne S, Noirot M (2014).** Cell wall composition in monosaccharides of *Coffea arabica* L. seedlings growing under daylight or darkness. Putative relation with caffeine and chlorogenic acid. Comparison between *Coffea arabica* 'Bourbon' and *Coffea arabica* 'Laurina'.

Pour chaque partie, la synthèse des travaux est réalisée suivant le modèle d'un article scientifique : problématique, méthodologie, résultats et discussion. Les deux thématiques sont abordées et les articles correspondants sont groupés à la fin de ce chapitre.

# **I. La lumière est impliquée dans l'expression de la mutation *laurina* chez *C. arabica* L. Impacts sur le semi-nanisme, le nombre de cellules et les profils hormonaux dans les hypocotyles**

## **I.1 Problématique**

Jusqu'à maintenant, aucun travail n'a étudié l'impact de la mutation *laurina* sur les plantules. Chez les plantes, la photomorphogénèse induit une inhibition de la croissance de l'hypocotyle. Les expériences précédentes menées sur les graines de BP ont mis en évidence une sensibilité de BP vis-à-vis de l'exposition à la lumière (voir chapitre II, 1<sup>er</sup> article). Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'exposition à la lumière de plantules de B et BP pendant leur croissance. Les premiers résultats concernent la comparaison morphologique entre les plantules de B et BP poussant à la lumière ou à l'obscurité. La seconde partie met l'accent sur la croissance de l'hypocotyle (division et/ou l'élongation cellulaire). La question est la suivante : la mutation *laurina* affect-elle la division ou l'élongation cellulaire ou les deux ? Et pour finir, les changements morphologiques dans les plantules de BP par rapport à B pourraient être dus à des variations de phytohormones. La quantification des gibbérellines, auxines, ABA et leurs métabolites a donc été réalisée.

## **I.2 Méthodologie**

Des graines de B et BP ont été mises à germer dans deux conditions de culture : à la lumière et à l'obscurité. Quatre combinaisons ont été étudiées : B-lumière, BP-lumière, B-obscurité et BP-obscurité.

L'impact de la lumière sur la croissance de B et BP a été étudié. Les plantules dont la croissance des hypocotyles est terminée, c'est-à-dire aux cotylédons ouverts, ont été utilisées. Les trois parties des plantules ont été contrôlées soit qualitativement pour les racines (présence/absence de différences morphologiques), soit quantitativement pour l'hypocotyle et les cotylédons (mesure de la longueur et de l'aire, respectivement).

Ensuite, afin de déterminer si le semi-nanisme des hypocotyles est dû à un nombre moins important de cellules et/ou à des tailles de cellules plus petites, nous avons estimé la taille des cellules d'hypocotyles ayant poussé à la lumière. La première étape est de déterminer si la taille des cellules est identique quelle que soit sa location dans l'hypocotyle. Nous avons donc

coupé l'hypocotyle en 5 parties égales du haut vers le bas. Des coupes longitudinales ont été faites et la taille des cellules mesurées sur des images prises au microscope confocal avec le logiciel ImageJ. L'étape suivante a été de comparer la taille des cellules dans la partie médiane des hypocotyles pour 3 moments clés : 1/ l'hypocotyle n'est pas encore exposé à la lumière (20 jours après semi (JAS)), 2/ l'hypocotyle est exposé à la lumière (40 JAS) et 3/ 85% de la croissance de l'hypocotyle a été atteinte (60 JAS).

Pour déterminer l'éventuelle présence d'endoréduplication, la cytométrie de flux a été utilisée sur les hypocotyles de plantules à 20, 40 et 60 JAS.

Des analyses de phytohormones ont été réalisées sur des hypocotyles de plantules à 60 JAS ayant poussé à la lumière. Les phytohormones étudiées par chromatographie liquide ultra performance (UPLC) ESI-MS/MS sont l'acide abscissique, les cytokinines, les auxines, les gibberellines et leurs métabolites.

### **I.3 Résultats**

La morphologie des plantules a été comparée chez B et BP. A l'obscurité, il n'y a pas de différence entre B et BP. A la lumière, des différences apparaissent principalement pour les hypocotyles et racines. L'hypocotyle chez BP est plus petit que chez B ( $BP/B = 0.63$ ). BP présente plus de racines secondaires, mais sans changements majeurs pour la longueur de la racine principale. Pour les cotylédons, leur aire diminue légèrement chez BP. Puisque les différences entre BP et B apparaissent à la lumière, est ce que le nanisme de l'hypocotyle est dû à des cellules plus petites, à moins de cellules, ou les deux ?

La longueur des cellules de l'hypocotyle a été comparée (60 JAS), pour chaque variété, dans 5 parties différentes. La longueur des cellules est minimale au sommet de l'hypocotyle et maximale entre le milieu et la partie basale. Il est donc nécessaire d'estimer les tailles de cellules sur plusieurs coupes d'une même partie ainsi que de mesurer les longueurs des cellules sur le segment se trouvant au milieu de l'hypocotyle. La mesure de la longueur de ces cellules souligne l'absence de différence variétale.

Les longueurs des cellules d'hypocotyle en cours de croissance (20, 40 et 60 JAS) ont été comparées chez B et BP. Pour chaque date, il n'y a pas de différence variétale pour la taille des cellules. Ce résultat contraste avec les différences de longueurs d'hypocotyles observées à 40 et 60 JAS. Entre 20 et 40 JAS, le nombre de cellules se stabilise pour les deux variétés et

est environ 2 fois plus élevé chez B à 40 et 60 JAS. Aucune endoreduplication n'a été détectée. Le semi-nanisme serait donc dû à un nombre de cellules différent.

L'impact de la mutation sur la teneur en phytohormones a été étudié. Pour l'acide abscissique (ABA), seuls l'ABA, l'ABAGE et le DPA (les catabolites de l'ABA) ont pu être dosés, les autres catabolites n'étant pas détectés ou en très faible quantité. L'ABA et l'ABAGE sont significativement plus élevés chez BP par rapport à B. Par contre, il n'y a aucune différence variétale dans les niveaux en DPA et son coefficient de variation résiduel est élevé (67%).

Concernant les cytokinines, la zéatine (Z, et les isomères *trans* et *cis*) est absente, les précurseurs ribosides conjugués IPR et *c*-ZR sont détectés mais à de faibles quantités et l'isopentenyl adenine (IP) a été détectée mais à des niveaux non quantifiables. La concentration en Dihydrozéatine (dhZ) est faible et deux fois moins présente chez BP que chez B. *t*-ZR est présent en plus grande quantité que les formes précédentes de cytokinine, et deux fois plus chez BP. Finalement, les teneurs en catabolites de zéatine (*t*-ZOG et *c*-ZOG) sont plus élevées chez BP que chez B.

Pour l'auxine, seule la forme active biologique indole acide acétique (IAA) est largement présente. Elle est beaucoup plus élevée chez B que chez BP. Le ratio ZR/IAA est égal à 0.0498 chez BP et 0.0510 chez B.

Finalement, bien que recherchées, les gibbérellines sont soit non détectables, soit en dessous des limites pour une quantification précise.

En présence de lumière, la mutation affecte la croissance de l'hypocotyle en provoquant du semi-nanisme qui est dû à un nombre plus petit de cellules et à des changements dans les teneurs en ABA, cytokinines et auxine.

## I.4 Discussion

La mutation *laurina* a des effets pléiotropiques. Des études précédentes ont permis de quantifier et d'analyser les origines des modifications de la forme de l'arbre, des feuilles, du semi-nanisme des tiges (Lécolier et al., 2009b, 2009c), ainsi que les changements au niveau du fruit et de la graine (Adler et al., 2014). Cette étude met clairement en évidence d'autres effets pléiotropiques de la mutation, mais au niveau des plantules.

Les effets de la mutation nécessitent la lumière du jour avec pour principale conséquence un semi-nanisme de l'hypocotyle. Ceci caractérise des mutants de la photoréception. Par exemple, la surexpression du phytochrome A ou du cryptochrome 1 inhibe la croissance de l'hypocotyle chez *Arabidopsis* (Boylan & Quail, 1991 ; Ahmadet al., 1995). Chez BP, la lumière pourrait être à l'origine du semi-nanisme des feuilles et des entrenœuds mais aussi des modifications de formes de la graine (Lécolier et al., 2009a, 2009b ; Adler et al., 2014).

La différence de longueur d'hypocotyle entre B et BP n'est pas dû à des différences de longueurs de cellules entre B et BP (elles ne pas différentes pour chaque date) mais serait expliqué par un plus petit nombre de cellules (B contient plus de cellules que BP).

La croissance de l'hypocotyle de *C. arabica* est plus proche du modèle du tournesol (*Helianthus*) que d'*Arabidopsis*. En effet, à la différence d'*Arabidopsis*, *C. arabica* ne présente pas d'endo-réduplication (Gendreau et al., 1997) et comme chez le tournesol, le nombre de cellules corrélé avec la longueur de l'hypocotyle (Kutschera & Niklas, 2013).

La mutation modifie fortement les phytohormones et en particulier les cytokinines, l'auxine et l'ABA. Chez *C. arabica*, t-ZR, t-Z, t-ZOG et C-ZOG pourraient être impliqués dans le semi-nanisme de l'hypocotyle par le biais de diminutions de divisions cellulaires. Les teneurs en auxine diminuent, mais le ratio auxine-cytokinines n'est pas modifié par la mutation. La biosynthèse de ces deux hormones semble donc co-régulée chez BP. L'ABA possède des effets pléiotropiques et est connue pour inhiber les divisions cellulaires précoces pendant la germination (Da Silva et al., 2008). Elle pourrait aussi être impliquée dans le semi-nanisme de l'hypocotyle même si cela pourrait ne pas être son action majeure.

## **II. Comparaison de plantules B et BP poussant à la lumière ou à l'obscurité au niveau de la composition en monosaccharides pariétaux et des teneurs en CAF et CQA**

### **II.1 Problématique**

Des connaissances ont été acquises sur le modèle de croissance des plantules ainsi que sur l'impact de la mutation *laurina* à la fois sur la croissance de l'hypocotyle et les teneurs en phytohormones des cotylédons et hypocotyles. A notre connaissance, aucune étude ne s'est penchée sur la composition en polysaccharides de la paroi cellulaire (PPC) et monosaccharides de la paroi cellulaire (MPC) des plantules de caféiers et *a fortiori* sur BP. L'effet de la mutation sur les MPC et PPC de chaque partie de la plantule (racines, hypocotyle, cotylédon) exposées ou pas à la lumière a donc été étudié dans notre travail.

La mutation affecte la teneur en caféine de la graine, mais aucune donnée n'est disponible sur la plantule. D'autre part, la synthèse de la caféine est affectée par la présence ou pas de lumière. Donc, afin de caractériser au mieux l'effet de la mutation sur la plantule, les teneurs en caféine et en acide chlorogénique ont été déterminées par organe de plantules ayant poussé à la lumière ou à l'obscurité.

### **II.2 Méthodologie**

Le matériel végétal utilisé est le même que précédemment expliqué à savoir des graines de B et BP qui ont été mises à germer dans deux conditions de culture : à la lumière et à l'obscurité. Quatre combinaisons ont été étudiées : B-lumière, BP-lumière, B-obscurité et BP-obscurité. Les plantules sont récoltées au bout de 65 jours après semis (JAS) et partagées en 3 parties avant lyophilisation et broyage : cotylédons, hypocotyle et racines.

Comme pour les graines, l'étude de la composition en monosaccharides de la paroi cellulaire (MPC) a été réalisée suivant 3 étapes. La première consiste à isoler les résidus insolubles dans l'alcool grâce à une extraction à l'éthanol à 80°C. Le culot est ensuite hydrolysé avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 100°C. Le surnageant est appelé « fraction TFA » et est analysé en HPAEC-PAD afin d'identifier les monosaccharides hémicellulosiques. Le culot est hydrolysé à son tour avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et analysé en HPAEC-PAD pour déterminer la

composition en monosaccharides cellulosiques ou fortement liés à la cellulose. Ces échantillons sont appelés « fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ».

La composition en polysaccharides de la paroi cellulaire (PPC) des hypocotyles et des cotylédons ayant été exposés à la lumière est déterminée par perméthylation suivant le protocole de Kim & Carpita (1992). Les polysaccharides sont ensuite hydrolysés, réduits et dérivés comme décrit par Burton et al. (2000). Ces dérivés sont analysés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS). Les expériences ont été réalisées de la 10<sup>ème</sup> à la 18<sup>ème</sup> SAF (durant la période de croissance maximale de la graine).

La caféine et les acides chlorogéniques issus de chaque partie des plantules ayant poussé à la lumière ou à l'obscurité ont été extraits au méthanol et dosés en HPLC.

### **II.3 Résultats**

Les MPC identifiés dans la fraction TFA sont l'arabinose (Ara), le galactose (Gal), le glucose (Glu), le xylose (Xyl), le rhamnose (Rha) et le mannose (Man). L'Ara, le Xyl et le Gal représentent 97% de la teneur totale en MPC. Les MPC identifiés dans la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sont le Glu, le Xyl et le Man.

Le Glu de la fraction TFA est de l'amidon et celui de la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> serait issu de cellulose et de glucane. Le Xyl issu de la fraction TFA semble être du xylane ramifié alors que celui de la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> serait issu de l'hydrolyse de xyloglucane. Le Gal proviendrait de galactanes fortement ramifiés. L'Ara peut avoir plusieurs origines : des arabinanes, arabinogalactanes type II et des arabinoxylanes. Le Man et le Rha sont en très faibles quantités. Le 1<sup>er</sup> issu de la fraction TFA pourrait être obtenu à partir de l'hydrolyse de mannanes ou peut être du galactomannane, alors que celui de la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> proviendrait de glucomannane. Le Rha pourrait être inclus dans des chaînes latérales d'arabinogalactanes en tant que rhamnogalacturonane et/ou rhamnoarabinosyle.

Dans la fraction TFA, la composition des MPC diffère ni entre variétés ni entre conditions de croissance, mais les différences entre organes sont très importantes. Une seule composante explique 99.6% de la variation des MPC opposant les racines aux cotylédons, et l'hypocotyle comme intermédiaire. Dans les cotylédons, les arabinogalactanes et les arabinanes constituent 89% des PPC hydrolysés, alors que dans les racines, les arabinoxylanes et les arabinanes représentent 80%. Dans la fraction H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> la composition en PPC ne diffère pas entre variétés

et entre conditions de croissance, mais diffère entre organes avec une opposition des cotylédons avec les racines et l'hypocotyle. Le Glu qui serait issu de la cellulose est majoritaire. Les racines seraient plus riches en xyloglucanes et les cotylédons en glucomannanes.

La caféine (CAF) et les acides chlorogéniques (CQA) ont été dosés dans les racines, hypocotyle et cotylédons de plantules exposées ou non à la lumière. A l'obscurité, quel que soit l'organe, les teneurs en CQA ne présentent pas de différence variétale. Il en est de même pour les plantules exposées à la lumière. Cependant, les racines de plantules exposées à la lumière sont beaucoup plus riches que celles ayant poussé à l'obscurité. Un gradient croissant de CQA est présent dans la plantule, avec un minimum dans les racines et un maximum dans les cotylédons. Concernant la CAF, les teneurs sont les mêmes à la lumière et à l'obscurité, mais sont différentes entre variétés ( $B > BP$ ) et entre organes (cotylédons  $>$  hypocotyle  $>$  racines). Comme pour le CQA, la teneur en CAF suit un gradient croissant des racines vers les cotylédons. La mutation a un impact sur la teneur en CAF à la lumière et à l'obscurité. En étudiant le ratio CAF/CQA, il a pu être déterminé que la CAF est piégée par le CQA dans les cotylédons et les hypocotyles. Par contre, dans les racines de plantules ayant poussé à l'obscurité, la totalité de la CAF ne serait pas complexée avec le CQA et serait donc libre, ce qui n'est pas le cas à la lumière.

## **II.4 Discussion**

Cette étude a pour but de caractériser les MPC et les PPC ainsi que de doser la CAF et le CQA des différents organes de plantules ayant poussé à la lumière ou à l'obscurité.

Les PPC déduits des expériences de perméthylation sont la cellulose, les xyloglucanes, les glucomannanes, les arabinoxylanes, les arabinogalactanes et les arabinanes. A notre connaissance, aucune étude n'a concerné l'identification des PPC de plantules de *C. arabica*. Tous ces polysaccharides ont déjà été identifiés dans des graines, fruits et/ou des feuilles de caféiers (Wolfrom et al., 1961 ; Cecy & Correa, 1984 ; Fischer et al., 2001 ; Redgwell et al., 2002; Sutherland et al., 2004).

L'absence d'effet de la mutation sur la composition en PPC est inattendue. En effet, il n'y a pas de relation entre le semi-nanisme des hypocotyles qui est dû à un nombre moins important de cellules en présence de lumière (Adler et al., soumis) et la composition en PPC.



La composition en PPC change en fonction des organes en opposant les cotylédons aux racines, les hypocotyles étant intermédiaires, mais pas entre variétés. Ce phénomène a déjà été observé par Nevins et al. (1968) qui a étudié la composition en PPC de *Phaseolus vulgaris*. Les arabinogalactanes sont trouvés principalement dans les cotylédons comme polysaccharides de réserve (Seifert & Robert, 2007). Chez *C. arabica*, la même observation a été faite. Ils jouent aussi un rôle dans le développement de l'embryon, la formation des cotylédons et l'établissement de la morphologie des plantules chez *Nicotiana tabacum* (Quin et al., 2007). Les arabinoxylanes ont pu être identifiés dans différentes parties de dicotylédones comme le xylème du silène, les tiges de tabac les hypocotyles de lin ou encore les racines de *Sophora subprostrata*.

Peu de données sont disponibles sur les teneurs en CQA des plantules. La teneur en CQA étant plus faible dans les plantules que dans les graines à l'obscurité, cela suggère une remobilisation d'une part du CQA dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. La lumière devrait induire la néosynthèse de CQA (Aerts & Baumann, 1994). Pourtant sa teneur n'est pas influencée par la lumière. Donc, la néosynthèse serait contre balancée par la mobilisation dans la voie des phénylpropanoïdes. L'absence d'effet de la mutation et de la lumière sur le CQA ainsi que le gradient entre les cotylédons et les racines sont similaires avec la composition en PPC et en particulier concernant le xylose.

La mutation a un impact sur la teneur en CAF à la lumière et à l'obscurité. La CAF présente dans les plantules poussant à l'obscurité proviendrait uniquement de la graine. En effet, dans la graine, les teneurs en CAF représentent 0.6% MS chez BP et 1.2% MS chez B et le ratio BP/B est de 0.5 (Charrier & Berthaud, 1975). Ce ratio est aussi retrouvé dans tous les organes de plantules, qu'elles aient poussées à la lumière ou à l'obscurité. Donc l'effet de la mutation sur les plantules poussant à l'obscurité serait le témoin de l'effet maternel provenant des graines. La CAF est principalement présente dans les cotylédons et résiduelle dans les racines (Aerts & Baumann, 1994). Etant capable de traverser les membranes, elle semble avoir été piégée dans les cotylédons sous forme de chlorogénate de caféine.

Les cotylédons sont riches en CAF, CQA et arabinogalactanes. A l'inverse des cotylédons, les racines sont pauvres en CAF, CQA et riches en arabinoxylanes. Le ratio arabinogalactane/arabinoxylane pourrait donc être important pour comprendre le stockage de la caféine : **les parois cellulaires riches en arabinogalactanes pourraient permettre un meilleur stockage de la CAF par le biais du complexe de chlorogénate de caféine.**

## **Article 1 : Daylight is directly implied in the expression of the *laurina* mutation in *Coffea arabica* L. Impact on semi-dwarfism, cell number and hormonal profiles in hypocotyls**

Authors : Adler Sophie<sup>1</sup>, Verdeil Jean-Luc<sup>2</sup>, Conéjéro Geneviève<sup>3</sup>, Fock-Bastide Isabelle<sup>1</sup>, Zaharia L. Irina<sup>4</sup>, Sarrazin Amélie<sup>5</sup>, Hoareau Julien<sup>1</sup>, Noirot Michel<sup>6\*</sup>

Addresses:

<sup>1</sup> Université de la Réunion, UMR Cirad-Université PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 97410, 97410 St Pierre, Réunion, France

<sup>2</sup> Laboratoire PHIV, UMR AGAP INRA/CIRAD/SupAgro, 34000 Montpellier, France

<sup>3</sup> Laboratoire PHIV, UMR BPMP INRA/CNRS/SupAgro/UM II, 34000 Montpellier, France

<sup>4</sup> Aquatic and Crop Resource Development, National Research Council of Canada, 110 Gymnasium Place, Saskatoon, Saskatchewan S7N 0W9

<sup>5</sup> RIO Imaging platform, 34000 Montpellier France

<sup>6</sup> IRD, UMR Cirad-Université PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 97410, St Pierre, Réunion, France

Running Title : Semi-dwarfism, cell number and hormonal profiles in hypocotyls of *C. arabica* ‘laurina’

Corresponding author at UMR PVBMT, 7 Chemin de l’IRAT, Ligne Paradis, 97410 St Pierre, France. Tel: +33 2 62 49 92 36, E-mail address: [noirot@cirad.fr](mailto:noirot@cirad.fr)

Key words: *Coffea arabica* ‘Laurina’, hypocotyl semi-dwarfism, cell division, auxin, cytokinin, abscisic acid

Abstract: *Coffea arabica* ‘Laurina’ is a natural mutant of *Coffea arabica* ‘Bourbon’ (B) and is known under the trade name ‘Bourbon Pointu’ (BP). Under daylight, the *laurina* mutation leads to pleiotropic effects, including semi-dwarf hypocotyls. At the opposite, semi-dwarfism of BP seedlings disappeared under darkness conditions. The first step was to describe the morphological impact of the mutation in seedlings growing under daylight by comparison with seedlings growing under darkness.

As the hypocotyl length was mainly affected, the second step was to investigate histological modifications in the organ comparing B and BP seedlings growing under daylight. Result of this investigation indicated that the mutation does not impact on cell length. In addition, cytometry analyses showed absence of endoreduplication. In fact, the mutation influenced the

cell number and this effect appeared before the 40<sup>th</sup> day after sowing, i.e. probably between the 30<sup>th</sup> (date of emergence of the seedling) and the 40<sup>th</sup> day.

The length difference of hypocotyls between B and BP was due to lower cell number in BP, indicating possible involvement of phytohormones. Investigations of hormone levels in these tissues were carried out. The main result was the decrease of cytokinin and auxin levels in BP compared to B, while the cytokinin/auxin ratio remained constant in both varieties. By contrast, ABA content increased in BP. Concurrently these results indicate the lowering of cell division, due to the mutation.

## 1. Introduction

On the island of Réunion (France), a premium coffee is currently being developed from the Bourbon Pointu cultivar (BP), which corresponds botanically to *Coffea arabica* 'Laurina'. In fact, BP is a natural mutant of *Coffea arabica* 'Bourbon' (B) (Chevallier 1947; Lecolier *et al.* 2009a). The *laurina* mutation is a monolocus, recessive and Mendelian mutation (Krug 1954). The mutation is characterized by pleiotropic effects: smaller internodes and leaves, Christmas tree shape (Lecolier *et al.* 2009b, 2009c), better resistance to cold and drought (Chevalier 1947), seed development (Adler *et al.* 2014), and lower caffeine content in seeds (Charrier & Berthaud 1975). However, up to date no study regarding the impact of the mutation on seedlings has been reported.

Light is known to inhibit growth during photomorphogenesis (MacDougal 1903; Vince 1964). To limit interference between photomorphogenesis and photosynthesis, experiments are mainly carried out on seedlings (Withrow 1941). In all cases, photomorphogenesis induces hypocotyl growth inhibition. In this context, semi-dwarfism of BP could be determined by a higher sensitivity to daylight. Consequently, morphological comparison between B and BP seedlings growing under daylight or darkness could give a response to such hypothesis and this constituted the first aim of the present study.

The second aim was to investigate the origin of the semi-dwarfism in BP hypocotyls, which could depend on either cell division or cell elongation, or both. The cellular basis of hypocotyl growth is well known in *Arabidopsis* (Gendreau *et al.* 1997). In the species, hypocotyl size is tenfold shorter under daylight than under darkness. Especially, the epithelium cell number is fixed as soon as the beginning of the hypocotyl growth (absence of

cell divisions) under daylight or darkness. As for hypocotyl length, cell size is tenfold shorter under daylight. Under daylight, the cell elongation process begins at the lower most part of the hypocotyl and then affects all cells. In other species, as in lettuce (*Lactuca sativa*), the hypocotyl growth process differs (Stuart *et al.* 1977). Both elongation and cell division occurs, but cell division is not modified by darkness. Consequently, only cell elongation is affected by photomorphogenesis. Our investigation in coffee trees aims at better understanding 1) whether cell division and/or cell elongation contributes to hypocotyl growth and 2) whether the *laurina* mutation affects cell division or cell elongation or both.

Several phytohormones are known to regulate cell elongation and division. For example, gibberellin induces cell elongation in lettuce (Srivastava *et al.* 1975; Kawamura *et al.* 1976) and *Arabidopsis* (Cowling & Harberd 1999). Cell elongation is also induced by auxin (Baker & Ray 1965), through its effect on cell wall (Masuda 1990), and by brassinosteroids (Szekeres *et al.*, 1996) acting on microtubules (Catterou *et al.* 2001). The role of abscisic acid (ABA) depends on the organ: in rice, the fluridone, an inhibitor of ABA, stimulates the coleoptile growth and inhibits mesocotyl and root growth (Hoffmann-Bending & Kende 1992). Ethylene influences growth through its negative impact on the auxin transport (Burg & Burg 1967). Lastly, the importance of cytokinins in cell divisions has been first emphasized by Miller *et al.* (1955). It increases mitosis as shown in tobacco protoplasts (Meyer & Cooke 1979) and their levels shows a sharp peak at the end of the S phase (Redig *et al.* 1996), inducing D-type cyclin (Riou-Khamlichi *et al.* 1999). Thus, since morphological changes observed in the BP seedling compared to the B seedling could be due to variations in phytohormone levels, we have undertaken hormone analysis quantifying gibberellins, auxins, ABA and their metabolites in hypocotyls of B and BP seedlings growing under daylight.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Plant material*

In all experiments, fruits of varieties B and BP were depulped, parchment was removed and fresh seeds were immediately sown limiting their exposition to daylight.

### *2.2. Impact of daylight on B and BP growth*

Each combination – B-light, B-darkness, BP-light and BP-darkness – was represented by two germination boxes. In each box, 28 seeds were sown in moistened vermiculite. The boxes

were hermetically sealed after sowing and those for the darkness treatments were wrapped in aluminum foil. The location of the eight boxes was randomly determined and changed weekly. In the boxes, the relative humidity was saturated, whereas the mean temperature was 26°C. Boxes were kept in a shaded zone for 65 days. Daylight intensity was about 110  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  at 14 pm, while day length varied from 11 to 13 h. Regarding shading, there was a very small difference of temperature (0.1°C) within boxes between light and dark conditions.

Observations were qualitative in the case of roots monitoring the absence or presence of morphological differences. The hypocotyls and cotyledons were measured for length and area, respectively. For cotyledon-area measurements, cotyledons were scanned (Epson V500) and their images were analyzed using ImageJ software, (NIH, <http://www.rbs.info.nih.gov/ij>). Ten seedlings were sampled in each combination for these notations.

### *2.3. Histological studies on hypocotyls of B and BP seedlings growing under daylight*

Following the results of the first experiment, the cell lengths in hypocotyls of B and BP seedlings growing under daylight were compared, to indirectly estimate cell numbers. The experimental conditions were similar to the previous experiment except the absence of darkness treatment and the shortening of the experiment duration (60 days vs 65 days previously). Only a part of seedlings were used for the histological comparison and their hypocotyl lengths were measured.

First, in order to emphasize the different factors acting on cell size estimation, a preliminary histological study was carried out using one B and one BP hypocotyls. For each variety, the seedling was selected as showing the median hypocotyl length among a sample of 5 seedlings. Each hypocotyl was divided in 5 equal parts labelled from 1 (top) to 5 (base). For each part, three 60  $\mu\text{m}$  longitudinal-sections were microscopically studied. On each of the 30 longitudinal-sections, 20 cell lengths were estimated using the ImageJ software. A partly nested ANOVA was carried out for analyzing data. Principal factors were “seedlings” and “hypocotyl parts”, whereas longitudinal sections constituted the nested factor. Data were previously transformed using  $y = \ln(x)$ .

The next study consisted to compare cell lengths in the part # 3 of B and BP hypocotyls at 3 different growth dates: 20, 40, and 60 days after sowing (DAS). These dates were not selected at random. First, radicle protrusion happens 5 to 12 d after seed imbibition (Da Silva *et al.*

2005). Secondly, emergence of first seedlings over vermiculite happens around the 30<sup>th</sup> DAS in our experimental conditions. Consequently, 20 d-old seedlings were not exposed to daylight when they were sampled. At the opposite, about 85 % of the hypocotyl growth was ended at 60 d.

As for the last analysis, seedlings showing a median hypocotyl length within each modality were selected for the study. Three longitudinal sections per modality and 20 cell lengths were measured using ImageJ software.

In all analyses, longitudinal-sections were done using a HM 650 V vibrating blade microtome (Microm, Waldorf, Germany) and then dipped in a glycerol/water (50:50 v/v) solution saturated with ascorbic acid to prevent oxidation. Histological studies were carried out using a ZEISS LSM 780 multiphoton microscope (Zeiss, Iena, Germany), equipped with a pulsed laser Chameleon Ultra II Ti-Sapphire (Coherent, Santa Clara, California) and a 20x/0.8 Plan-Apo lens (Montpellier RIO Imaging platform, [www.mri.cnrs.fr](http://www.mri.cnrs.fr)).

A laser optimal excitation at 740 nm, reproducing laser UV monophotonic excitation with emissions from 426 to 732 nm allowed visualisation of the autofluorescence of cell walls.

#### 2.4. Cytometry investigations

Nuclei were extracted by chopping hypocotyls (Galbraith *et al.* 1983) in the lysis buffer as presented in Dolezel *et al.* (1989), with slight modifications (0.5% Triton X-100) and prepared just before use. The hypocotyl weight per unit volume of buffer was approximately 300 mg.ml<sup>-1</sup>. After chopping, the solution was filtered through nylon cloth (50µm mesh).

Nuclei were stained with propidium iodide (333 µg.ml<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, St Quentin, France). The staining time was about 3 min. A FACSCalibur cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was used with an argon laser (15 mW) at 488 nm. The high voltage was set at 400 V (Montpellier RIO Imaging platform, [www.mri.cnrs.fr](http://www.mri.cnrs.fr)).

#### 2.5. Phytohormone analysis

The comparison between B and BP hypocotyls of seedlings grown under daylight was completed by phytohormone analysis. 60-d-old seedlings were used for this experiment. On each seedling, hypocotyl was sampled and immediately frozen in nitrogen liquid and stored at – 80°C. Subsequently, samples were lyophilized and each sample was then weighed. As 50

mg of dry matter were required for analysis, 3 hypocotyls were pooled for constituting the sample.

Abscisic acid, cytokinins, auxins, gibberellins and their metabolites were quantified in lyophilized hypocotyls by UPLC ESI-MS/MS at the National Research Council (Saskatoon, Saskatchewan, Canada) using deuterium labeled internal standards.

The procedure for sample preparation and quantification of phytohormones in plant tissue was performed as described in detail in Lulsdorf *et al.* (2013). Results were expressed in nanograms per gram of dry weight. Data were analyzed using ANOVA using the data transformation  $y = \log(x + 1)$ . We considered an effect, or a difference, as being significant only when  $p < 0.001$ . When the F test was significant, a Bonferroni comparison of means was carried out. All results were analysed using the Statistica software package (6.1 version, 1997 for Microsoft Windows; StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Morphological comparison between BP and B seedlings growing under darkness or daylight

Under darkness, there was no qualitative morphological difference between B and BP seedlings (Fig. 1). The hypocotyl lengths were 9.30 and 9.36 cm (standard deviation = 0.88 cm) in BP and B, respectively, and the difference was not significant ( $p = 0.89$ ).

Under daylight, B and BP seedlings showed morphological differences, mainly concerning hypocotyls and roots (Fig. 1). Hypocotyl length was significantly lower in BP (4.5 cm vs 7.15 cm;  $s = 0.81$  cm;  $p < 0.000002$ ), with a BP/B ratio of 0.63. The hypocotyl length ratio for light/darkness conditions was 0.76 for B and 0.48 for BP. For the root system, BP showed more secondary roots, without major changes in the main root length. In the case of cotyledons, visual differences between varieties seemed minor (Fig. 1), but their area decreased slightly in BP, with a BP/B ratio of 0.77. Most importantly, the morphological differences between BP and B appeared only under daylight conditions. This led to the next question: is hypocotyl dwarfism due to decrease in cell length or cell number or both?

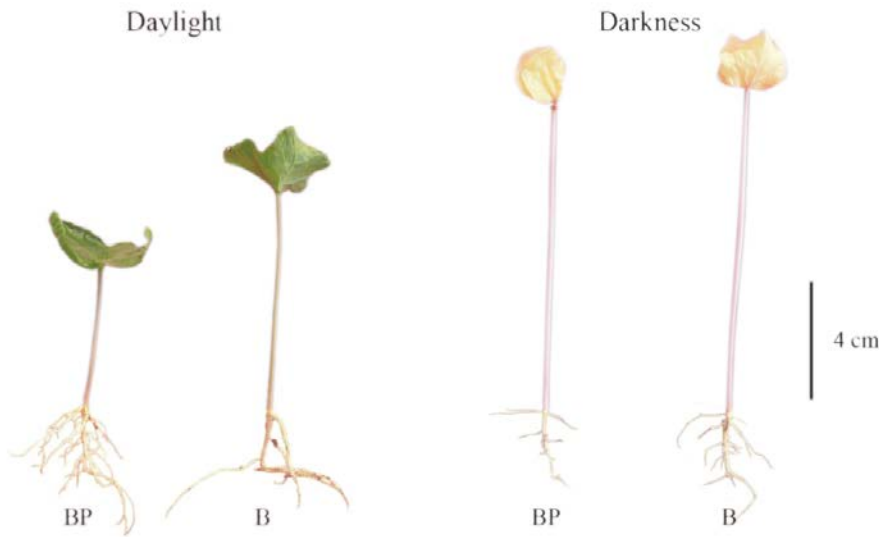


Figure 1. Bourbon (B) and Bourbon Pointu (BP) seedlings grown under light and dark growing conditions.

### 3.2. Histological comparison between BP and B hypocotyls of 60 d-old seedlings growing under daylight

In the first histological experiment, the aim was to compare, at 60<sup>th</sup> DAS, cell lengths in hypocotyl of one seedling of each variety, but at 5 different locations on the hypocotyl. Hypocotyl lengths were 67.0 and 36.5 mm in B and BP seedlings respectively ( $BP/B = 0.54$ ). Results indicated significant differences between longitudinal-sections within locations ( $p < 1 \times 10^{-6}$ ) showing the necessity to estimate cell sizes from several longitudinal sections. There were also significant differences of cell lengths between locations within the hypocotyls ( $p = 0.039$ ) with a minimal cell length at the top of the hypocotyl and a maximal between the medium and the base parts. Consequently, in the next experiments, the cell lengths were measured on the medium segment of the hypocotyl. The ANOVA showed no difference in cell length between the two seedlings B and BP ( $p = 0.89$ ), with 138 and 140  $\mu\text{m}$  on average in B and BP seedling hypocotyls, respectively (Fig. 2).



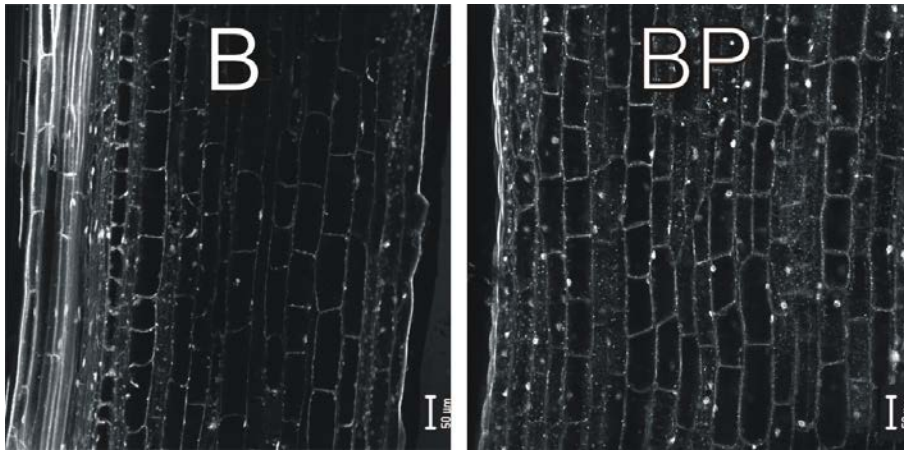


Figure 2. Longitudinal sections realized in the median part of B and BP hypocotyls illustrating the absence of cell length differences.

### 3.3. Histological comparison between BP and B hypocotyls of 20, 40 and 60 DAS seedlings growing under daylight

Further on the cell lengths at different dates of hypocotyl growth, i.e. at 20, 40, and 60 DAS in B and BP, were compared. Results showed no differences in hypocotyl length at D20 between B and BP, i.e. before seedlings were exposed to daylight (Table 1).

	B	BP	BP/B ratio
D20	4.3	4.5	1.05
D40	43.5	19.4	0.45
D60	67.0	36.5	0.54

Table 1. Hypocotyl lengths (mm) of histologically studied samples (hypocotyls were measured on a seedling of median size (see Materials & Methods)

As shown in the first histological experiment, significant variation was confirmed between longitudinal sections ( $p < 1 \times 10^{-6}$ ). Cell length increased dramatically from D20 to D60 ( $p < 1 \times 10^{-6}$ ). Notably, the absence of difference between B and BP was also confirmed ( $p = 0.69$ ). Consequently, cell lengths, estimated on average from both varieties, were 44, 98, and 161  $\mu\text{m}$  at D20, D40, and D60, respectively. The absence of variety difference over time for cell lengths contrasted with observed difference of hypocotyl length at D40 and D60. From these results, differences of hypocotyl length could be attributed to differences of cell number. Consequently the number of cells present along the hypocotyl length was estimated. This led to 98, 444 and 416 cells in B at D20, D40, and D60, respectively. In BP, estimations were

102, 198, and 226 cells at D20, D40, and D60, respectively. In fact, cell number was stabilized between D20 and D40 in both varieties and was about twofold higher in B at D40 and D60. Lastly, results obtained using flow cytometry led to reject the presence of endoreduplication regardless the part of the hypocotyl (Fig. 3).

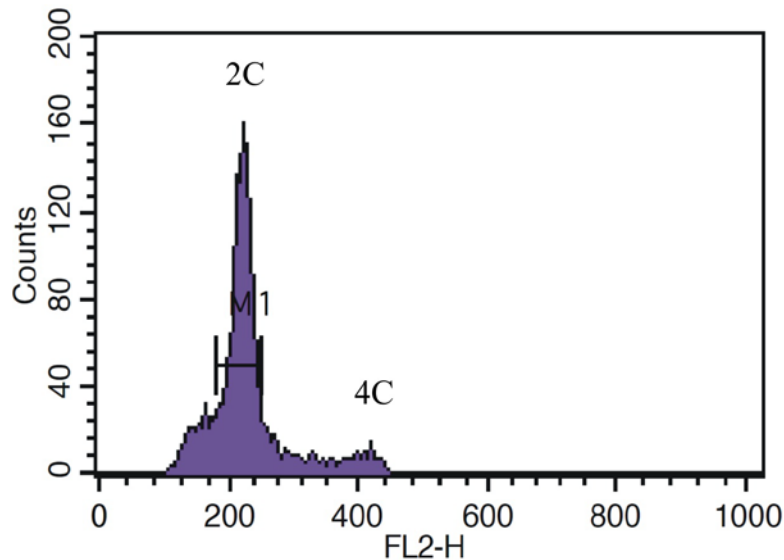


Figure 3. Peaks 2C and 4C observed at the top of 60 d-old hypocotyls in Bourbon obtained using cytometry

### 3.4. Impact of the mutation on phytohormones in hypocotyls

Results showed that ABA and its catabolites, namely dihydrophaseic acid (DPA) and abscisic acid glucose ester (ABAGE) were present in both varieties. Other ABA catabolites were not detected, whereas *trans*-ABA was found in few samples at low level ( $<9 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$ ). Similarly, phaseic acid (PA) was detected in only 40% of samples and its detection did not depend on the variety. As such, the statistical analysis of only ABA and its catabolites DPA and ABAGE was considered. Results indicated that ABA and ABAGE levels were significantly higher in BP compared to B (Table 2). By contrast there was no varietal difference in DPA levels and a high residual coefficient of variation (67%) for this trait was present.

	B	BP	BP/B	p
ABA	116	344	2.96	0.00006
ABAGE	19	69	3.68	0.0005
DPA	109	123	1.13	0.82

Table 2. ABA, ABAGE and DPA concentrations (ng.g<sup>-1</sup> DW) in hypocotyls of B and BP 60d-old seedlings.

Among active cytokinins, zeatin (Z, trans and cis isomers) were not observed, whereas isopentenyl adenine (IP) was detected, but at no-quantifiable levels ( $< 2$  ng.g<sup>-1</sup> DW). Dihydrozeatin (dhZ) levels were low ( $< 9$  ng.g<sup>-1</sup> DW) (Table 3). Its level in BP was twofold less present than those present in B, however the difference was weakly significant. Precursor riboside conjugates IPR, *c*-ZR and *t*-ZR were detected, however at low levels below  $< 10$  ng.g<sup>-1</sup> DW for IPR and *c*-ZR. IPR levels showed significant difference between varieties (Table 3). In fact, only *t*-ZR was present in relatively abundant quantities, being twofold lower in BP. Lastly, zeatin catabolites namely glucoside conjugates *t*-ZOG and *c*-ZOG were also quantifiable, BP showing higher levels than B (Table 3).

	B	BP	BP/B	P
dhZ	6.0	3.4	0.57	0.029
IPR	8.3	2.6	0.31	0.0008
<i>c</i> -ZR	4.3	3.0	1.13	0.24
<i>t</i> -ZR	50.0	26.6	0.53	0.026
<i>c</i> -ZOG	15.9	88.1	5.54	$< 0.00001$
<i>t</i> -ZOG	16.4	49.2	3.0	$< 0.00001$

Table 3. dhZ, IPR, *c*-ZR, *t*-ZR, *c*-ZOG, and *t*-ZOG concentrations (ng.g<sup>-1</sup> DW) in hypocotyls of B and BP 60d-old seedlings.

In case of auxins, only the biologically active form indole acetic acid (IAA) was found in good amounts. All other conjugated forms that were screened were not detected. In fact IAA level was 594 and 1065 ng.g<sup>-1</sup> DW in BP and B, respectively, and the difference was highly significant ( $p < 0.00001$ ). Lastly, the (Z + ZR)/IAA ratio was computed as recommended by

Smigocki and Owens (1989). In our case, it was simplified into ZR/IAA and led to 0.0498 and 0.0510 in BP and B, respectively.

Lastly, although monitored in these tissues gibberellins were either not detected or below limits of accurate quantification.

## 4. Discussion

### 4.1. Morphological expression of the laurina mutation required photomorphogenesis

The morphological similarity between B and BP seedlings under darkness contrasted with the marked modifications under daylight conditions. The mutation would necessarily require light to be morphologically active. Such observation characterizes some mutants of the photoreception. For example, overexpression of phytochrome A or cryptochrome 1 inhibits hypocotyl growth in *Arabidopsis* (Boylan & Quail 1991; Ahmad *et al.* 2002).

A natural mutant showing higher growth inhibition in the presence of daylight constitutes a novel trait in the *Coffea* genus. Such effect due to light can only be revealed in seedlings, where interferences between photomorphogenesis and photosynthesis are limited (Withrow 1941), but it could also be the origin of semi-dwarfism in leaves and internodes (Lecolier *et al.* 2009b, 2009c), as well as of seed shape modifications (Adler *et al.* 2014).

### 4.2 The effect of the mutation on hypocotyl in the presence of light affected the cell number

Before discussing about the effect of the mutation on the hypocotyl growth, it is important to comment our observed results on hypocotyl growth in regards with the two main models of hypocotyl growth, i.e. *Arabidopsis* vs sunflower, opposing presence or not of endoreduplication, respectively. In *Arabidopsis*, hypocotyl growth does not significantly involve cortical or epidermal cell divisions (Gendreau *et al.* 1995). The difference in hypocotyl length between seedlings growing in darkness or daylight depends on the number of endoreduplication cycles (3 vs 2, respectively), whereas cells are strongly elongated compared to the embryo (10-fold and 100-fold increase in daylight and darkness conditions, respectively) (Gendreau *et al.* 1995). By contrast with the *Arabidopsis* model, in sunflower cell number is correlated to the hypocotyl length, with a lower cell number in daylight than in darkness (Kutschera & Niklas 2013). In the species, cell division activity is restricted to the top of the hypocotyl and slows down when the hypocotyl length progressively reaches its final size. Cell elongation also participates to the hypocotyl growth and is strongly inhibited

by photomorphogenesis. In sunflower, hypocotyl growth results from 3 processes: cell division in hypocotyl meristematic zones, cell elongation of G0-phase-cells that have left the meristem, and the cell wall maturation (Kutschera & Niklas 2013).

The absence of difference in cell length between B and BP at each of the three dates (D20, D40, and D60) contrasted with hypocotyl length difference, such as observed at D40 and D60. This implies that growth differences between B and BP could be due to cell division. Moreover, endoreduplication was also not present in hypocotyls. Consequently, hypocotyl growth in *C. arabica* is closer to the sunflower model than to the *Arabidopsis* one. Notably, the effect of the mutation on mitosis would appear as soon as the seedling reached daylight, i.e. between D30 and D40 and cell number would be fixed at this moment. Consequently, only cell elongation would occur after D40.

#### *4.3 The effect of the mutation on hypocotyl cell number is coherent with its effects at the phytohormone level*

Although phytohormone measurements were taken for the 60 d-old hypocotyl, for which most of the growth (about 85%) was achieved, differences were recorded between B and BP for ABA, ABAGE, IPR, dhZ, *t*-ZR, *t*-ZOG, *c*-ZOG, and IAA. Except for dhZ, *t*-ZR and IAA, levels of ABA, ABAGE, IPR, *t*-ZOG, and *c*-ZOG were higher in BP than in B.

As the main growth difference involved cell number, cytokinins were thought to be the cause for such changes. In higher plants, cytokinin exists in both the *cis*- and the *trans*-configuration (Schmitz *et al.* 1972) with little interconversion between the two forms (Gajdosova *et al.* 2011). The *trans/cis* ratio varies between species but also between developmental stages as in *Arabidopsis* where dry seeds contrasted to adult plants (Gajdosova *et al.* 2011). In *C. arabica*, the *trans/cis* ratio was high in the case of precursor riboside conjugates. So, *t*-ZR levels were 9- to 11-fold higher than *c*-ZR ones in BP and B, respectively. By contrast, the ratio was very different for glucoside conjugates (catabolites) with 0.53 vs 1.03 in BP and B, respectively. All these results emphasize the complexity of the functional analysis for these two groups of isomers.

IP, dhZ, *t*-Z and *c*-Z are considered as active forms (Mok *et al.* 1978). All but dhZ were absent in hypocotyls and this could reflect the very small importance of cytokinin targets - the meristematic tissues - at D60. By contrast with active forms, ZOG and ZR products showed

higher concentrations on average. Notably, the impact of the mutation on their levels contrasted ZOG and ZR products.

The role of riboside conjugates - *c*-ZR and *t*-ZR – is complex. On one hand, they are considered as precursors of *c*-Z and *t*-Z, respectively (Chen & Kristopeit 1981a), and on the other hand, the reaction is reversible (Sondheimer & Tzou 1971; Suttle & Banowetz 2000) suggesting a role of storage. Most importantly, there are two zeatin biosynthesis pathways. The second one is able to give directly *t*-Z from the ribotide conjugate, without production of the intermediate form *t*-ZR through the cytokinin-specific phosphoribohydrolase, named ‘Lonely guy’ (LOG) (Kurakawa *et al.* 2007). In addition, recent results show clearly that in *Arabidopsis*, disruption of several LOG genes leads to severe growth retardation (Tokunaga *et al.* 2012). This effect strongly suggests a low impact of the zeatin ribotide–zeatin riboside pathway in the zeatin production. Lastly, *t*-ZR could have another role and would be implied in long-distance translocation of cytokinins (Beveridge *et al.* 1997) as an acropetal messenger (Kudo *et al.* 2010). *c*-ZR could have a similar role but that has not yet been demonstrated. In *C. arabica*, the mutation reduced *t*-ZR level in hypocotyls, but had no effect on *c*-ZR. As *t*-Z increases cell division (Riou-Khamlichi *et al.* 1999) and taking in account the putative role of *t*-ZR as precursor of *t*-Z, a lower *t*-ZR level could explain morphological changes in BP. By contrast, the absence of difference between B and BP for *c*-ZR level did not explain the morphological impacts of the mutation on hypocotyls.

*t*-ZOG is an inactive storage form of *t*-Z (McGaw *et al.* 1985). In hypocotyls, the effect of the mutation led to reduced *t*-ZR content and, at the opposite, increased *t*-ZOG level. Less *trans-zeatin* precursor and more storage form is coherent with lower growth by cell division. *c*-ZOG is also considered as an inactive, reversible and storage form (Pineda Rodo *et al.* 2008). Notably, this storage form is 5.8-fold more abundant in BP hypocotyls than in B ones. Consequently, for *t*-ZOG and *c*-ZOG, storage would be a form of deactivation at the origin of their semi-dwarfism. Such hypothesis is supported by results recorded in rice, where overexpression of *cZOGT1* and *cZOGT2* genes leads to semi-dwarf plants (Kudo *et al.* 2012).

Auxin is known to induce cell elongation (Baker & Ray 1965) through its effect on cell wall loosening (Vanderhoef & Dute 1981). As auxin level was twofold lower in BP hypocotyls, it is expected smaller cell size in this variety, but this was not the case. In fact, the cytokinin-to-auxin ratio has to be taken in account (Smigocki & Owens 1989). In the case, the mutation

had no effect on the ratio which would be balanced to control cell division. In BP, there was a co-decreasing of auxin and cytokinin levels suggesting a co-regulation in the biosynthesis of both hormones.

Levels of ABA and its storage form ABAGE also showed an effect of the mutation, being more abundant in BP. Its role depends on the organ, inhibiting the coleoptile elongation and inducing mesocotyl and root growth (Hoofmann-Bending & Kende 1992). In coffee, ABA is also known to inhibit embryo cell expansion and early cell division during germination (Da Silva *et al.* 2008). Consequently ABA could also be a candidate, as cytokinin and auxin, to explain hypocotyl semi-dwarfism. Nevertheless, we have to keep in mind that ABA shows pleiotropic effects as stomatal closure (Cummins *et al.* 1971) and could also constitutes one of the pleiotropic effect of the mutation without major impact on hypocotyl size.

A paradox exists when the sampling time for hormonal dosages (D60) is taken in account. Indeed, at the date, cell number was fixed and growth was almost ended. Only elongation processes would be present and these processes did not lead to cell size differences between B and BP. This suggests that 1/ hormonal crosstalk, which differed between varieties, had no effect on cell elongation; and 2/ especially, the cell division inhibition would be always present at D60 since probably D30.

#### 4.4. For summarizing

The effects of the mutation *laurina* are pleiotropic. Previous studies permitted to quantify and analyse the origins of tree shape modifications, leaf and stem semi-dwarfism (Lecolier *et al.* 2009b, c), fruit and seed changes (Adler *et al.* 2014). This study clearly showed another pleiotropic impact of the mutation, but at the seedling level. Four main results were emphasized here. Firstly, the effects of the mutation required light to be present, leading mainly to hypocotyl semi-dwarfism. Secondly, the difference of hypocotyl length between B and BP is due to a decrease in the number of cells. Thirdly, as in *Helianthus* there is no endoreduplication and this led to another model than the Arabidopsis one. Lastly, but expected from previous results, the mutation strongly modified the phytohormone balance, especially cytokinins, auxin and ABA.

#### Acknowledgement

This study was financially supported by the European Union, the Conseil Régional of Réunion and the French Institut pour la Recherche et le Développement (IRD). The authors thank Dr. Xiumei Han, Vera Cekic and Dang Van for excellent technical assistance. They also thank Pr. Charrier for its helpful comments.

## **Article 2 : Comparison between seedlings of *Coffea arabica* L. ‘Laurina’ and ‘Bourbon’ growing in daylight or darkness for their monosaccharidic cell wall composition and their caffeine and chlorogenic acid contents.**

Sophie Adler, Gregory Mouille, Isabelle Fock-Bastide, Tony Palama, Sylvie Citerne, Michel Noirot

**Abstract :** *Coffea arabica* ‘Laurina’, a natural mutant of *Coffea arabica* ‘Bourbon’ (B), is also known as ‘Bourbon Pointu’ (BP). Under daylight, the *laurina* mutation leads in seedlings to semi-dwarf hypocotyls, but this effect disappeared under darkness conditions. The first step of our work was to analyze the impact of the mutation on monosaccharide cell wall composition in cotyledons, hypocotyls and roots in relation with growth conditions (daylight vs darkness). In a second step, the same type of comparisons was carried out for caffeine and chlorogenic acid (CQA) contents.

Seven new results were emphasized: Firstly; cell wall polysaccharides (CWP) present in cotyledons, hypocotyls and roots were identified. Secondly, neither the *laurina* mutation, nor the growth conditions had an impact on CWP composition. By contrast, strong differences existed between cotyledons, hypocotyls and roots for their CWP composition and their CQA and caffeine contents. Lastly the mutation and the light did not modify CQA content in the three organs, whereas the mutation, but not the light, lowered CAF content.

**Keywords :** *Coffea arabica* ‘Laurina’, cell wall polysaccharides, chlorogenic acid, caffeine, seedlings

### **1. Introduction**

*Coffea arabica* ‘Laurina’, i.e. ‘Bourbon pointu’ (BP) is a natural mutant of *C. arabica* ‘Bourbon’ (B) (Chevalier 1947; Lecolier et al; 2009a) which appeared in cultivation at La Réunion Island (France). The *laurina* mutation is epigenetic, recessive, monolocus and Mendelian (Krug 1954). It is characterized by pleiotropic effects including smaller internodes and leaves, Christmas tree shape (Lecolier et al. 2009b, 2009c), as well as better drought and cold resistance (Chevalier 1947), seed development modifications (Adler et al. 2014) and lower caffeine (CAF) content in seeds (Charrier and Berthaud 1975). The mutation also



affects, only under daylight, seedling growth causing hypocotyl semi-dwarfism due to fewer numbers of cells and changing in phytohormone level concerning abscissic acid, cytokinin and auxin (Adler et al. submitted).

In plants, quinic acid esters are represented by hydroxycinnamoylquinic acids (HQA). They are particularly important in coffee plants (Streuli, 1970; Amorin et al., 1974; Maier, 1987), especially in seeds (Clifford, 1985). 98% of HQA contents are caffeoylquinic acids (CQA), dicaffeoylquinic acids (diCQA) and feruloylquinic acids (FQA) (Clifford et al., 1989). Caffeine (the 1,3,7-trimethylxanthine) is also an important compound in coffee seeds of cultivated species *C. arabica* and *C. canephora* Pierre (Charrier & Berthaud, 1975). Caffeine is trapped by the chlorogenic acid to form the complex caffeine chlorogenate (Payen, 1846; Horman & Viani, 1972) in a 1:1 molecular ratio (Sondheimer et al., 1961). Caffeine and chlorogenic acid are also present in young seedlings of *C. arabica* 'Catuai', but mainly in cotyledons (98%) (Aerts & Baumann, 1994). As in seeds and calli, apoplast or cell walls are supposed storage location of caffeine chlorogenate by Baumann (1989) and Dentan (1977), respectively, the higher caffeine content in cotyledon in regards to hypocotyl and roots could be due to their cell wall composition.

In plants, the cell wall polysaccharides (CWP) are cellulose, hemicellulose and pectin (Darvill et al. 1980). Among them, the cellulose, the most known, is a polymer containing 500 to 14000 residues of  $\beta$ -(1,4)-D-glucose (Ferrier, 1960; Somerville, 2006). In hemicellulose, the backbone can be glucans, galactans, mannans or xylans. It can be partially substituted and ramified leading to arabinogalactans, xyloglucan, etc (Aspinall, 1983; Brett & Waldron, 1996; Kacuráková et al., 2000). For example, xyloglucan is constituted by a backbone of  $\beta$ -(1,4)-D-glucose with regular branching with  $\alpha$ -(1,6)-xylose which can be branched further with  $\beta$ -(1,2)-galactose residues. The third class, the pectin, is characterized by a backbone of (1,4)-linked  $\alpha$ -D-galacturonic acid units. This chain may be interrupted by (1,2)- $\alpha$ -L-rhamnose bearing some side chains mainly composed of galactose and arabinose units (Voragen et al., 1995). Lastly, xyloglucans, glucomannans and cellulose are formally cross-linked in the cell wall (McCann et al., 1990; McCann & Roberts, 1994; Carpita & Gibeaut, 1993; Atalla et al., 1993; Whitney et al., 1999).

In the paper, our first aim was to know the monosaccharidic and polysaccharidic cell wall composition of cotyledons, hypocotyls and roots in coffee seedlings of B and BP varieties growing in daylight or dark conditions. Our second aim was to highlight the putative

relationship between the caffeine and chlorogenic acid contents and the cell wall sugar composition.

## 2. Materials and methods

### *Plant material*

Two homozygote lines of varieties B and BP (*C. arabica* L.) were used in the study. Their fruits were depulped, parchment was removed and fresh seeds were immediately sown. In the first experiment concerning cell wall composition, seedlings grew in natural daylight (intensity =  $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  at 14 pm and day length varied from 11 to 13 h) or in dark conditions for 65 days. Each combination – B-light, B-darkness, BP-light and BP-darkness - was represented by two germination boxes.

In each box, 28 seeds were sown in moistened vermiculite. Then, boxes were hermetically sealed and wrapped in aluminum foil in the case of darkness treatment. The location of the boxes was randomly defined and changed weekly. In the boxes, the relative humidity was saturated, whereas the mean temperature was 26°C.

At the end of each experiment, seedlings were split into 3 parts: cotyledons, hypocotyl and roots which were frozen in liquid nitrogen before to be stored at -80°C, lyophilized and ball milled (30 vibrations/sec, 30 sec).

### *Analysis of cell wall monosaccharide (CWM) composition*

Two main steps were carried out to analyze CWM composition: 1/ hemicellulose and pectin hydrolysis using trifluoroacetic acid (TFA), and 2/ cellulose, xyloglucan and glucomannan hydrolysis using  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

### Hydrolysis of alcohol insoluble residue (AIR) using trifluoroacetic acid (TFA)

The powder of the different modalities (100 mg) was mixed with 5 mL of ethanol (96%) using a vortex, incubated in a bain-marie (80°C, 15 min) and centrifuged (5000 rpm, 10 min). After centrifugation, two fractions were collected: the pellet and the supernatant. This extraction was realized 3 times and supernatants were pooled. Then, the pellet was washed twice with 5 mL of acetone. The AIR (remaining pellet) was dried overnight at room temperature to remove all residual traces of humidity. Five replicates (10 mg) were obtained from the AIR.

In a first step, 2.5 M TFA (500 $\mu$ L) were added to the AIR and incubated at 100°C for 2 h leading again to two fractions: the supernatant and the pellet. The supernatant was called TFA fraction. It was diluted 500 times in deionized water leading to a final volume of 2 mL. On the other side, the pellet was washed with water, ethanol 96% (twice) and acetone and dried over night at room temperature.

#### Hydrolysis of residual pellet using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

In a second step, the pellet was hydrolyzed with 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (125  $\mu$ L) at room temperature for 1 h to obtain the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction. 1.5 mL of water was added and the solution was shaken for 2 h at 100°C. The supernatant was transferred and 15 $\mu$ L was diluted in 2mL of water.

#### HPAEC-PAD monosaccharide analysis

Diluted TFA and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fractions were filtered (filter syringe, Anatop™, retention 0.2  $\mu$ m, WHATMAN®). Monosaccharide separation was performed on a PA20 column (Dionex, Sunnyvale, CA) at a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup>. Monosaccharides were detected using a pulsed amperometric detector (gold electrode) set on waveform A according to manufacturer's instructions. A calibration curve of monosaccharide standards (Sigma-Aldrich) was run for verification of response factors. Two elution programs were necessary to analyse, on the one hand glucose, galactose, mannose and xylose contents and on the other hand arabinose and rhamnose contents because of their coelution in the first program. Four solvents were successively used: A: NaOH 50mM, B and D: Water, and C: NaOH 300mM. Table 1 gives HPAEC-PAD conditions to analyse glucose, galactose, mannose and xylose contents, while table 2 includes HPAEC-PAD conditions to analyse arabinose and rhamnose contents.

Time (min)	% A	% B	% C	% D
0	5	47.5	0	47.5
40	5	47.5	0	47.5
40.1	100	0	0	0
50	100	0	0	0
50.1	5	47.5	0	47.5
65	5	47.5	0	47.5

Table 1. HPAEC-PAD conditions to analyse glucose, galactose, mannose and xylose contents

Time (min)	% A	% B	% C	% D
0	100	0	0	0
8	100	0	0	0
8.1	0	0	100	0
16	0	0	100	0
16.1	100	0	0	0
23	100	0	0	0

Table 2. HPAEC-PAD conditions to analyse arabinose and rhamnose contents

*Analysis of CWP using permethylation*

Linkage analysis of polysaccharides from cotyledons and hypocotyls of seedlings growing in daylight conditions were realized in B and BP. Samples were permethylated as described by Kim and Carpita (1992). Permethylated polysaccharides were then hydrolyzed, reduced and derivatised as described by Burton et al. (2000). The derivatives were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS Agilent technologies). A 25-m x 0.22-mm (i.d.) BPX 70 column (SGE Analytical Science) was used for all separations. Identification of the derivatives and deduction of the glycosidic linkages were based on both the elution order of standards and fragment ion signatures.

*Caffeine and chlorogenic acid extraction and dosage*

Each part of seedlings, which were frozen at -80°C for 1 hour, was crushed in a ball mill. Crushing yielded a fine powder (5 min per lot). Three biological repetitions were realized. Each sample was extracted with a mix of methanol (99%) and water (75/25). Then they were heated (80°C, 30 min), sonicated (30 min) and centrifuged (13000 rpm, 15 min). The supernatant was removed and put into vials of 2 mL. Four technical replicates were carried out for high performance liquid chromatography (HPLC).

The supernatant was analyzed by HPLC, coupled to a UV spectrophotometer. The elution program used two solvents, A and B. Solution A was 0.1% of acetic acid in 95% of millipored water and 5% of methanol. The solution B was 0.1% of acetic acid in 5% of millipored water and 95% of methanol. These two phases were degassed and sonicated before use. Sample and standard were analyzed at room temperature using the following program: 0 min, A-B mixture (75/25); 0-20 min, B from 25% to 52% of linear gradient; 20-22min, B from 52% to 100%. Flow rate was 0.8 mL/min in a LiChroCART ® 250-4 column (Merk KGaA, Germany). The analysis was performed on 20µL of each sample and four technical repetitions

were realized. UV detection was carried out at a wavelength of 272 nm and 327 nm, corresponding to the caffeine and CQA maximum absorption, respectively.

### *Statistical analysis*

HPAEC-PAD data were statistically analysed using Statistica 6 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). A 3-way ANOVA with fixed effects was carried out in the case of monosaccharide contents. Independent factors were variety (B vs BP), growing condition (daylight vs darkness) and organ (cotyledons – hypocotyls – roots). Absence of biological replicates led to assume the absence of interaction “variety x growing condition x organ”, and to take it as residual for F tests as in Latin square models.

The 3-way ANOVA was also carried out in the case of data on caffeine and CQA contents. Nonetheless, the presence of biological replicates permitted the use of the complete model. In addition, data were previously transformed using  $y = \text{Log}(x + 1)$ . Consequently, as each biological replicate was constituted by the pool of two seedlings, the estimation of the between-seedlings standard deviation (residual mean square) was done using  $s = 1.414 \times \sqrt{(\text{MS}_{\text{residual}})}$ . This estimation corresponded in fact to the variation coefficient of the variable before logarithmic transformation and were given in corresponding result tables. Lastly, in all analyses, post-hoc multiple mean comparisons were done using the Bonferroni test.

A principal component analysis (PCA) with varimax normalized option was also carried out in order to determine how many components can explain the CWM diversity observed in varieties and organs.

## **3. Results**

### *CWP deduced from permethylation analysis*

In all samples, the TFA fraction contained six sugars, i.e. arabinose (Ara), galactose (Gal), glucose (Glu), xylose (Xyl), rhamnose (Rha) and mannose (Man), but no fucose. Among these monosaccharides, Ara, Xyl and Gal represented 97% of the total monosaccharide content on average (Table 3). Permethylation analyses were carried out on cotyledons and hypocotyls of both varieties.

Glu residues were 1,4-D-Glu and 1,4,6-D-Glu (Fig. 1). The terminal residue (*t*-Glu) was not detected, showing that its relative part in the polysaccharide chain was negligible. Lastly the

branching ratio was about 2.0-2.3% and did not depend on either the organ or the variety. These data are characteristic of starch.

Xyl residues were 1,4-D-Xyl, 1,4,6-D-Xyl, and *t*-Xyl (Fig. 1). Concerning *t*-Xyl, there was no varietal difference. By contrast, its proportion in CWP was higher in cotyledons (42%) than in hypocotyls (18%). Presence of 1,4-D-Xyl, 1,4,6-D-Xyl suggested existence of xylans. The latter would be constituted by a backbone of (1,4)-D-xylose ramified in (1,2,4)-D-xylose with a branching rate of 10% in hypocotyl and 18% in cotyledons.

Gal residues were 1,6-D-Gal, 1,3,6-D-Gal, 1,4,6-D-Gal and *t*-Gal (Fig. 1). As for *t*-Xyl, there was no varietal difference for *t*-Gal, while it represented 49% and 28% of Gal residues in cotyledons and hypocotyls CWP, respectively. The other residues suggested the presence of ramified galactans. The backbone of 1,6-D-galactose is strongly ramified (76% and 69% in cotyledons and hypocotyls, respectively). Notably, the 1,4,6-D-Gal/(1,3,6-D-Gal + 1,4,6-D-Gal) ratio was about 80% and did not depend on either the organ or the variety.

Ara showed five types of residues, i.e. 1,2-D-Ara, 1,3-D-Ara, 1,5-D-Ara, 1,2,5-D-Ara and *t*-Ara. As for Xyl and Gal, there was no varietal difference for *t*-Ara, but especially, there was also no difference between organs and this *t*-residue represented 55% of Ara on average. The interpretation of Ara residues is more complex due to the fact that arabinose has been found in several polysaccharides: arabinans, arabinogalactans type I, arabinogalactans type II and arabinoxylans. Concerning arabinans, this would include 1,5-D-Ara and 1,2,5-D-Ara. Their ramification rate would be slightly higher in hypocotyls (36%) than in cotyledons (29%).

Mannose existed in low level (Table 3) and relative proportions of residues were more erratic than for Glu, Xyl, Gal and Ara. Man residues were 1,4-D-Man, 1,2,4-D-Man, 1,4,6-D-Man and *t*-Man (Fig. 1). *t*-Man represented 22% of Man residues on average. Notably, the 1,4-D-Man and 1,4,6-D-Man would imply the presence of mannans with a very ramified (75%) backbone of 1,4-D-mannose. These mannans could be in fact galactomannans, known in coffee seeds, but existing at very low level in seedlings.

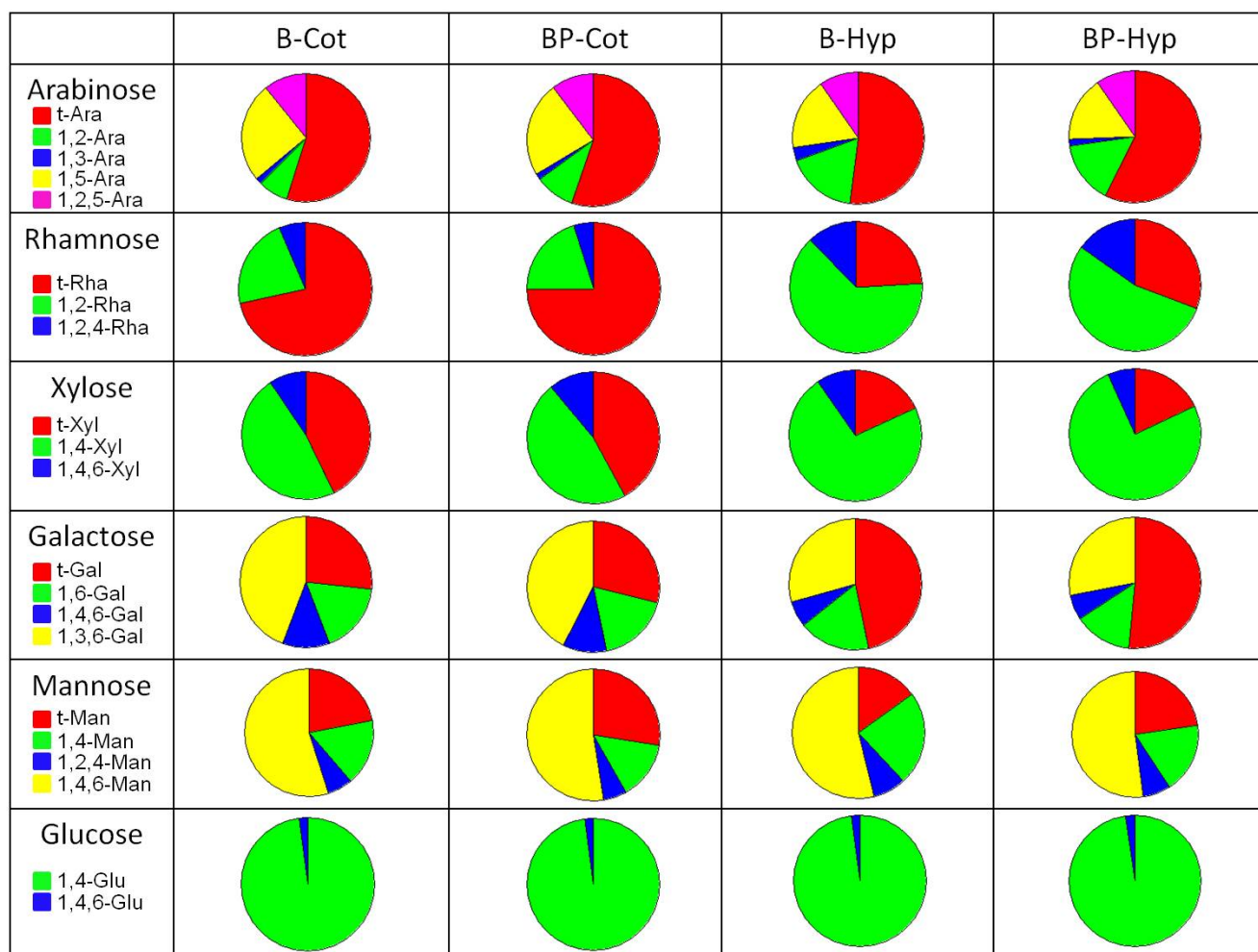


Figure 1. Relative percentage of each linkage type for arabinose, rhamnose, xylose, galactose, mannose and glucose in B and BP cotyledons and hypocotyl.

As for mannose, rhamnose existed a low level (Table 3). Their residues included 1,2-D-Rha, 1,2,4-D Rha and *t*-Rha (Fig. 1). The *t*-Rha proportion differed strongly between organs, representing 73% and 27% of Rha residues in cotyledons and hypocotyls, respectively. Other residues would be included in rhamnan chains with a medium ramification rate (25%). The low rhamnose levels suggested the weak presence of rhamnogalacturonan and/or rhamnoarabinoxyl, a side chain of the arabinogalactans.

For summarizing, when taking in account the whole of permethylation results, xylans would be more precisely arabinoxylans, where side chains would include 1,2-D-Ara, 1,3-D-Ara and *t*-Ara. Similarly, galactans would be arabinogalactans type II, where side chains would include 1,3-D-Ara and *t*-Ara. Consequently, most CWP of seedlings would be arabinogalactans, arabinoxylans and arabinans.

*Composition of the CWP*

Notably, the monosaccharide composition of the TFA fraction of CWP did not differ between B and BP or between growing conditions. By contrast, there were important modifications between organs (Table 3). According to a PCA analysis, using arabinose, galactose and xylose as variables, 99.6% of the variation is explained by only one component. It opposed roots and cotyledons, hypocotyls being intermediate. Cotyledons contained mainly arabinose and galactose, while root CWM were composed of xylose and arabinose. The hypocotyl TFA fraction of CWP was principally composed of arabinose, galactose and xylose (Table 3).

	Arabinose	Rhamnose	Galactose	Xylose	Mannose
Roots	38,67 <sup>b</sup>	2,24 <sup>b</sup>	17,54 <sup>c</sup>	41,19 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup>
Hypocotyl	43,56 <sup>ab</sup>	2,05 <sup>b</sup>	24,09 <sup>b</sup>	29,26 <sup>b</sup>	1,03 <sup>a</sup>
Cotyledons	49,66 <sup>a</sup>	3,67 <sup>a</sup>	38,91 <sup>a</sup>	7,05 <sup>c</sup>	0,71 <sup>a</sup>

Table 3. Relative contents of arabinose, rhamnose, galactose, xylose and mannose in the TFA fraction (expressed in %). Letters indicate results of the Bonferroni test. Residual standard deviations were 3.49, 0.27, 2.80, 5.04 and 0.85 for arabinose, rhamnose, galactose, xylose and mannose, respectively.

As arabinose, galactose and xylose would rise from arabinoxylans, arabinogalactans and arabinans hydrolysis, it can be deduced that arabinogalactans and arabinans would constitute about 89% of CWP hydrolyzed by TFA in cotyledons. At the opposite, arabinoxylans and arabinans would represent about 80% of CWP hydrolyzed by TFA in roots.

Monosaccharides of the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction were glucose, xylose and mannose, the glucose being large majority (Table 4). These monosaccharides would rise from the hydrolysis by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> of xyloglucans, glucomannans and cellulose, the three polysaccharides being cross-linked in the cell wall. As for the TFA fraction, there was no distinction between varieties or between growing conditions. By contrast, only significant difference was highlighted between organs, contrasting cotyledons to hypocotyl and roots. Notably, xylose and mannose highlighted a negative correlation between organs, the roots showing the highest xylose and the lowest mannose levels.



	Glucose	Xylose	Mannose
Roots	89,69 <sup>b</sup>	8,07 <sup>a</sup>	2,25 <sup>b</sup>
Hypocotyl	89,29 <sup>b</sup>	6,80 <sup>a</sup>	3,91 <sup>ab</sup>
Cotyledons	92,90 <sup>a</sup>	2,27 <sup>b</sup>	4,83 <sup>a</sup>

Table 4. Relative percentages of glucose, xylose and mannose in the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fraction. Letters indicate results of the Bonferroni test. Residual variation coefficients were 1.34, 0.83, 0.75 for glucose, xylose and mannose respectively.

*Comparison of caffeine and chlorogenic acid content in B and BP seedlings growing under darkness or daylight*

In darkness condition, there was no difference in CQA content between B and BP whatever the organ. So the mutation wouldn't have effect on this trait in darkness (Table 5). Cotyledons were richer in CQA than hypocotyls and roots, hypocotyls being an intermediate. In daylight, the mutation did not modify the CQA level whatever the organ. As in darkness, cotyledons were the richest in CQA and root the poorest. Especially, the CQA content in roots was 25.6 times more important in daylight than in darkness, whereas in cotyledons and hypocotyl there would not be difference due to the presence of daylight. On average, 99.6% and 91.8% of CQA content were recovered in aerial parts of B and BP seedlings in darkness and daylight conditions, respectively.

	Darkness		Daylight	
	B	BP	B	BP
Cotyledons	114 <sup>a</sup>	102 <sup>a</sup>	107 <sup>a</sup>	133 <sup>a</sup>
Hypocotyl	42 <sup>b</sup>	51 <sup>b</sup>	61 <sup>b</sup>	61 <sup>b</sup>
Roots	0.8 <sup>d</sup>	0.5 <sup>d</sup>	17 <sup>c</sup>	15 <sup>c</sup>

Table 5. CQA levels in cotyledon, hypocotyl and roots of B and BP growing under daylight or darkness. Levels are expressed in  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  of dry matter (DM). 100  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  of dry matter (DM) corresponded to 3.54% of CQA content. The between-seedling coefficient of variation was about 28%.

A 3-way ANOVA showed differences of CAF content between varieties ( $p = 0.011$ ) and especially between organs ( $p = 0.0005$ ), but no significant impact of growth conditions ( $p = 0.13$ ). As for CQA content, the CAF content decreased from the cotyledons to the roots

whatever the growth conditions (Table 6). But the more interesting result concerned the presence of varietal difference even in darkness conditions. The BP/B ratio was 0.61 and 0.57 on average in darkness and daylight, respectively. In both conditions, 99.2% of CAF was distributed in aerial parts.

	Darkness		Daylight	
	B	BP	B	BP
Cotyledons	108 <sup>a</sup>	76 <sup>b</sup>	142 <sup>a</sup>	95 <sup>b</sup>
Hypocotyl	49 <sup>c</sup>	22 <sup>d</sup>	43 <sup>c</sup>	23 <sup>d</sup>
Roots	1.2 <sup>e</sup>	0.8 <sup>f</sup>	1.7 <sup>e</sup>	0.9 <sup>f</sup>

Table 6. Caffeine level in cotyledon, hypocotyl and roots of B and BP growing under darkness and daylight. Levels are expressed in  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  of dry matter (DM). 100  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  of dry matter (DM) corresponded to 1.94% of CAF. The between-seedling coefficient of variation was about 19%.

No difference in CQA content, but differences in CAF content, between varieties implied varietal differences for the CAF/CQA ratio. In addition, absence of impact of daylight on CQA and CAF contents in the case of cotyledons and hypocotyls allowed estimating of the CAF/CQA ratio in cotyledons ( $\text{CAF/CQA} = 0.93$ ) and in hypocotyls (0.67). This means that all CAF would be trapped by CQA in both organs. The case of roots was particular due to the impact of daylight on CQA content, but not on CAF content. In darkness, the CAF/CQA ratio was expected to be 2.23 and 1.31 in B and BP respectively, suggesting presence of free caffeine. By contrast, it would be 0.091 and 0.053 in B and BP roots of seedlings growing in daylight, respectively.

#### 4. Discussion

Our study led to 6 main new results: 1/ the identification of CWP in seedlings; 2/ the absence of impact of the *laurina* mutation on CWP; 3/ the absence of light effect on CWP; 4/ strong differences between cotyledons, hypocotyls and roots for their cell wall composition; 5/ no impact of the mutation and light on CQA content, coupled with strong differences between organs; and 6/ an effect of the mutation on CAF content. This will also lead to discuss on putative links between CWP and CAF.

*New insight on polysaccharides in coffee seedling cell walls*

The coffee seedling cell wall was mainly composed of six CWP, i.e. cellulose, xyloglucans, glucomannans, arabinoxylans, arabinogalactans and arabinans. All these polysaccharides have already been identified in coffee, but only in seeds and/or leaves (Wolfrom et al., 1961, 1965; Cecy et al., 1984; Fisher et al., 2001; Redgwell et al. 2002; Sutherland et al., 2004), confirming our interpretation of permethylation results recorded here.

*Absence of effect of the mutation *laurina* on CWP composition*

The absence of effect of the mutation *laurina* on the CWP composition is the unexpected result of this study. Indeed, the mutation is known for its pleiotropic effects concerning shoot apical meristems, leaves, tree shape, seeds development (Lecolier et al. 2009b, 2009c; Adler et al., 2014). Especially, the mutation leads to hypocotyl semi-dwarfism in seedlings growing under daylight. In the case, semi-dwarfism is due to lower cell number (Adler et al., submitted). Obviously, there was no relationship between semi-dwarfism and cell wall composition.

*Absence of effect of the growing conditions (light vs dark) on CWP composition*

To our knowledge, this work represented the first demonstration of the absence of difference in CWP composition in relation with growing condition in coffee seedlings. In *Hymenaea courbaril*, xyloglucan content in cotyledons increases when light intensity decreases (Santos & Buckeridge, 2004). By contrast, in coffee, xyloglucan content did not vary in light or dark growth condition. Indeed, whatever the organ (cotyledons, hypocotyl and roots), their CWP composition was the same in both conditions.

*CWP composition changes between organs*

Contrasting with the absence of mutation impact and light effect, difference in CWP composition concerned organs. Indeed, CWP composition opposed cotyledons and roots while the one of hypocotyl was intermediate. Nevins et al. (1968) studied CWP composition in roots, hypocotyl and cotyledons in three varieties of *Phaseolus vulgaris*. As in coffee seedlings, CWP composition does not change between varieties but differs between organs.

A trade-off was present between xylose and galactose in the TFA fraction. Arabinogalactans would be more abundant in cotyledon CWP than in root CWP, while the inverse was

observed for arabinoxylans. This trade-off would be represented by the only one principal component explaining the diversity between the three organs for the CWP composition. Arabinogalactans are considered as a reserve polysaccharide in the cotyledon and participate to cell division and cell expansion (Seifert and Robert, 2007). In *Nicotiana tabacum*, the arabinogalactans would play a role in embryo development, cotyledon formation and seedling morphology establishment (Quin et al., 2007). At the opposite, arabinoxylans have been recorded in xylem of silene and tobacco stems and flax hypocotyl, as well as in *Sophora subprostrata* roots (Dong and Fang, 2000; McCartney et al., 2005). The relative importance of arabinoxylans could reflect the relative importance of sclerenchyma and xylem structures in the organ.

#### *Absence of effect of the mutation on CQA content and relationship with CWP*

Up to date, few data concerned CQA contents in young *C. arabica* seedlings (Aerts & Baumann, 1994). CQA was present in seeds before the germination and its presence in seedlings growing under darkness would rise from seeds and not from photosynthesis. As the CQA content was lower in seedlings than in seeds (Aerts & Baumann, 1994), this also suggests the re-mobilization of a part of CQA in the phenylpropanoid pathways (Mondolot et al., 2006; Joet et al., 2010).

Our results also showed that more of 90% of CQA were present in aerial parts of the seedling. Theoretically, presence of light induces CQA neosynthesis (Baumann and Rohrig 1989; Baumann et al. 1991, 1993; Aerts and Baumann 1994). Nonetheless, CQA content was not influenced by daylight. This suggests that neosynthetized CQA would be balanced by their mobilization in the phenylpropanoid pathway.

The absence of effect of the mutation and daylight on CQA content in cotyledons and the strong decreasing from cotyledons to hypocotyls were strongly similar with our observations on CWP composition. In particular, the relationship between changes of xylose and CQA contents becomes clear. Such relationship was overall true when including roots. Only the significant impact of daylight on CQA content in root was not related to a similar effect on xylose content in CWP. Nonetheless, it can be underlined that 1/ CQA in roots concerned only less than 10 % of CQA; and 2/ the impact of daylight reached an organ protected from light. In the case, the effect of daylight could be due to a minor impact on CQA transport or CQA biosynthesis signaling.

*Impact of the mutation on CAF content*

By contrast with CQA content, CAF content showed varietal differences. Especially the difference was present even in darkness. As for CQA, CAF present in seedlings growing in darkness would only rise from seeds, where CAF content represents 0.6% and 1.2% DM on average in BP and B respectively, leading to  $BP/B = 0.5$  (Charrier & Berthaud 1975). Similar ratio was observed in our study concerning seedlings growing in daylight or darkness whatever the organ. Consequently, the effect of the mutation in seedlings growing under darkness would be the witness of the maternal effect from the seed.

The effect of the mutation on the caffeine ratio was also present in daylight. In the case, this also could result of the maternal effect of the seed. Nonetheless, we cannot exclude the direct effect of the mutation, which is known to be expressed in daylight conditions. Both hypotheses should be taken in account.

Confirming previous results (Aerts & Baumann, 1994), CAF was mainly present in cotyledons and residual in roots. As CAF is known for its capacity to through membranes (Baumann & Rohrig, 1972), including human brain ones, its main presence in cotyledons strongly suggest that CAF was trapped as caffeine chlorogenate in this organ. This hypothesis was confirmed by the CAF/CQA ratio close to 1 in both varieties.

As for CQA, the strong variations between organs can be related with xylose content changes from cotyledons to roots. Indeed, cotyledons, rich in CAF and CQA, were characterized by a high content of arabinogalactans and low arabinoxylans content. At the opposite, arabinoxylans would be predominant in roots where CAF and CQA are residual. Consequently, the ratio arabinogalactan/arabinoxylan, which measures a trade-off, could be important in the understanding of caffeine storage: arabinogalactan-rich cell wall could allow better storage of CAF, through the CAF/CQA complex. In the case, the initial step would be the binding between CQA and arabinogalactans, and then the binding between CAF and CQA, which is known to be genetically regulated (Ky et al. 2013).

## Chapitre IV : Conclusions et perspectives

### I. Conclusions

L'objectif de cette thèse était de caractériser les effets de la mutation *laurina* sur les graines au cours de leur développement et les plantules de caféier. Elle a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur *C. arabica* ainsi que sur la mutation *laurina*. Deux grandes approches ont été abordées : la première est de type histo-morphologique et la seconde biochimique. Pour chaque aspect, et tout au long de la thèse, les deux variétés (Bourbon et Bourbon pointu) ont été comparées, afin de caractériser les effets pléiotropiques apportés par la mutation *laurina*.

Les principaux résultats dégagés au cours de cette étude sont :

#### **I.1 De nouvelles connaissances sur les fruits et les graines de *C. arabica***

Chez les graines de *C. arabica*, les connaissances sur les structures internes du fruit de caféier ont pu être améliorées par rapport aux données présentes dans la littérature. En effet, l'utilisation de microscope multiphotonique confocal a permis d'identifier la zone méristématique du mésocarpe qui est à l'origine des cellules de la parche, et ainsi différencier la parche de l'endocarpe.

La comparaison des graines et des fruits des deux variétés au cours de leur développement a été possible grâce à la standardisation des paramètres de croissance. En effet, l'approche histo-morphologique a permis de caractériser le développement du fruit de façon précise. Ainsi, les stades de développement des fructifications, leurs caractéristiques morphologiques et l'âge des fruits ont pu être mis en relation. Cette approche a permis d'identifier des dates clés dans le développement du fruit correspondant à des stades de développement : les semaines 6, 12, 16 et 20, représentant respectivement les stades 2, 3, 4 et 5 décrits par Salmona et al. (2008). Au cours de ces stades de développement, la graine est d'abord composée de périsperme, puis l'endosperme prend la place du périsperme en même temps que la graine augmente de taille ; par la suite l'endosperme devient laiteux puis dur. La 20<sup>ème</sup> SAF est caractérisée par un endosperme aux parois épaisses. Les données en microscopie optique

ont permis de déterminer qu'il ne semblait pas y avoir de différence entre B et BP. La mutation affecte la forme des fruits et des graines aboutissant à une plus grande fréquence de fruits étroits chez BP que chez B. Ceci est dû à l'absence de relation entre la longueur et la largeur chez BP.

## **I.2 La mutation *laurina* a un impact sur la l'histo-morphologie et la biochimie des graines au cours du développement**

La variation histo-morphologique observée des graines est due à l'absence de relation entre la longueur et la largeur des graines de BP par rapport à B, d'où l'existence de graines très étroites chez BP et non chez B. Ces graines très étroites ont comme caractéristique une paroi plus épaisse. La fréquence de ces graines augmente sur les caféiers sous ombrage (Adler et al., 2014).

Afin de déterminer si la mutation avait un impact sur les parois de l'endosperme au cours de son développement, les mono et polysaccharides, qui composent environ 60% des parois, ont été étudiés. Très peu de connaissances sont disponibles sur l'évolution de leurs compositions dans les graines de café (Fischer et al., 1999 ; Redgwell et al., 2003). La paroi de l'endosperme est composée de galactomannanes, arabinogalactanes, arabinanes, cellulose et de xyloglucanes. Ainsi trois phases de développement ont pu être mis en évidence : une première (stades 1-2 et 3) caractérisée par une augmentation des arabinoxylanes et une diminution des arabinogalactanes, la deuxième (stades 3, 4 et 5) avec une augmentation des galactomannanes et enfin la troisième (stade 5) pendant laquelle la ramification des galactomannanes diminue et provoquerait le durcissement des parois de l'endosperme. Les différences variétales concernent uniquement les phases 1 et 2. Ces variations dans les teneurs en PPC et MPC seraient dues à l'effet maternel par la présence de périsperme.

## **I.3 L'effet de la lumière sur la plantule de BP : caractérisation du semi-nanisme des hypocotyles**

La plantule se développe grâce aux ressources accumulées par la graine. En effet, la mobilisation des parois cellulaires de l'endosperme au cours de la germination fournit une source de sucres pour la croissance de la plantule. L'embryon contenant peu de réserves stockées, il dépend des nutriments de l'endosperme jusqu'à ce que la plantule devienne autotrophe (Giorgini & Campos, 1992). Chez les plantules de BP, les hypocotyles exposés à

la lumière présentent un semi-nanisme par rapport à ceux de B. Ceci est dû à un nombre plus restreint de cellules et non pas à des cellules plus petites. Le nombre de cellules est corrélé à la longueur de l'hypocotyle chez *C. arabica*.

Des différences variétales dans les concentrations en hormones (auxine, ABA, cytokinines) ont été mises en évidence. Elles joueraient un rôle indirect dans le nombre de divisions cellulaires et pourraient expliquer, en partie, le semi-nanisme de l'hypocotyle de BP par rapport à B.

Les mono et polysaccharides pariétaux ont été étudiés et les parois des plantules sont composées de cellulose, xyloglucanes, glucomannanes, arabinoxylanes, arabinogalactanes et d'arabinanes. Il n'y a pas de différence variétale dans la teneur en PPC des plantules, mais en fonction des organes les compositions en polysaccharides pariétaux sont différentes. En étudiant en parallèle la composition en PPC et en CAF et CQA, il semblerait que les parois cellulaires riches en arabinogalactanes (cotylédons) pourraient permettre un meilleur stockage de la CAF par le biais du complexe de chlorogénate de caféine. Et au contraire, les parois riches en arabinoxylanes (racines) sont pauvres en CAF.

## II Perspectives

Quelques pistes de recherche peuvent être envisagées afin de confirmer et compléter le travail réalisé au cours de cette thèse :

### II.1. La caractérisation de CAF, CQA et chlorogénate de caféine

La CAF et le CQA sont deux molécules d'importance gustative dans le café. Elles se complexent sous forme de chlorogénate de caféine (Horman & Viani, 1972 ; Kappeler et al., 1987 ; Payen, 1846 ; Sondheimer et al., 1961).

#### - Localisation

Au cours du développement de la graine, la localisation cellulaire du CQA change. En effet, il est d'abord vacuolaire, puis migre vers l'espace pérимembranaire et les parois cellulaires au cours du stade 5 (Dentan, 1985 ; Noirot comm. pers.). A ce moment là, la croissance de la graine est terminée et les parois cellulaires sont rigides, ce qui est dû à l'accumulation de



galactomannanes et la diminution de leur ramification (Redgwell et al., 2003). Concernant les plantules, seuls les cotylédons sont riches en CAF et CQA. Quels sont les points communs entre une paroi de graine et de cotylédon ? Des expériences de couplage d'anticorps spécifiques permettraient, par immuno-localisation, de situer de façon précise ces composés au sein des tissus tout au long de la croissance de la plantule (à partir de l'imbibition jusqu'à l'ouverture des cotylédons) et des graines.

### **- Moyen de stockage**

\* Etude biochimique : Le stockage du CQA dans la paroi à maturité ainsi que des expériences préliminaires suggérant une différence d'extractibilité au cours du développement de la graine, indiqueraient une possible liaison du CQA aux PPC. L'identification du polysaccharide (ou de la protéine) responsable de la liaison du CQA, de la CAF ou du chlorogénate de caféine avec la paroi cellulaire permettrait d'optimiser l'extraction de la CAF ou du CQA des graines de café. Ainsi une gamme d'enzymes spécifiques à chaque PPC permettrait d'identifier la nature de la liaison : les xyloglucanases pour les polysaccharides de type xyloglucanes (Grishutin et al., 2004), les mannanases pour les polysaccharides de type mannanes (Reid & Meier, 1973), les arabinanases pour les polysaccharides de type arabinanes (Shallom & Shoham, 2003), les galactanases pour les polysaccharides de type galactanes (Carey et al., 1995), les lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) pour la cellulose (Vaaje-Kolstad et al., 2010).

\* Etude par la microscopie : Il serait intéressant de mettre potentiellement en relation la composition en MPC et PPC avec les teneurs en CAF et CQA. BP et B, dont on connaît l'évolution en PPC au cours du développement, sont de très bons candidats. Cependant, afin de mieux étudier cette relation, il serait intéressant de comparer deux espèces de caféiers pour lesquels 1/ la CAF et le CQA sont en faible quantité, et 2/ la CAF et le CQA sont en grande quantité. Ainsi d'après les travaux de Campa et al. (2005), d'une part, *C. pseudozanguebariae*, *C. salvatrix*, *C. humblotiana* et d'autre part *C. canephora*, *C. brevipes*, *C. humilis*, *C. stenophylla* seraient à comparer. Des études préliminaires en microscopie confocale ayant été réalisées sur *C. pseudozanguebariae* et *C. canephora* (M. Noirot Comm. Pers), il serait judicieux de les utiliser pour des expériences ultérieures. D'autre part, *C. arabica* serait issu d'une hybridation entre *C. eugenioides* et *C. canephora* (Lashermes et al., 1999), il serait intéressant d'ajouter *C. eugenioides* aux études.

### - Potentiels effets sur la plantule

La germination de la plantule est plus rapide chez BP que chez B. La caféine est connue pour être un inhibiteur de la division cellulaire. Les graines de B sont plus riches en caféine que les graines de BP. La caféine pourrait donc être impliquée dans le retard de germination des graines de B. A 60 JAS, les plantules de B et BP présentent toujours cette différence de teneur en caféine. Le rapport BP/B pour la caféine dans les graines est de 0.65 et dans les plantules de 0.64. Les teneurs dans la graine conditionneraient les teneurs dans les plantules. Afin de vérifier cette hypothèse, le dosage de la caféine au cours du développement de la plantule serait à mettre en place à des dates clés. Ces dates clés seraient : le jour de l'imbibition, 7 jours après imbibition, 20 JAS (l'hypocotyle n'est pas encore exposé à la lumière), 40 JAS (l'hypocotyle est exposé à la lumière) et 65 JAS (comme date témoin de fin de croissance de l'hypocotyle et de l'ouverture des cotylédons).

## II.2. Etude de l'expression des gènes potentiellement touchée par la mutation *laurina*

Le développement de la graine de *C. arabica* a pu être découpé en stades ou en phases en fonction de l'étude respective du développement histo-morphologique ou de l'évolution de la composition en PPC et MPC. D'autre part, parmi les stades de développement, des dates clés ont pu être mises en évidence (semaines 6, 12, 16 et 20).

L'étude comparative de l'expression des gènes qui pourraient être affectés par la mutation pourrait être affinée en fonction des stades ou des phases. Par exemple, un des résultats de la thèse est que la mutation affecte les teneurs en PPC et MPC des graines jusqu'à la fin de la phase 2. L'étude ciblée de l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de polysaccharides pour les phases 1 et 2 chez B et BP serait une perspective à développer. Les résultats pourraient déboucher sur une meilleure compréhension des phénomènes transcriptionnels qui contrôlent le développement de la graine. A terme, ces données permettraient de caractériser, sur les graines, l'impact de la mutation *laurina* au niveau transcriptomique.

Concernant les plantules, l'étude de l'expression de certains gènes codant pour des enzymes impliquées dans la réception de la lumière, le nanisme, la synthèse ou la dégradation de la paroi, la biosynthèse de la caféine et de l'acide chlorogénique, la voie de biosynthèse des

phytohormones ... permettraient de mieux comprendre les effets activateurs de la lumière sur la mutation *laurina* ; mais aussi d'avoir une meilleure connaissance des plantules de *C. arabica* qui ne sont que peu étudiées.

### **II.3. Etude de la sensibilité de BP à la lumière**

D'après de précédentes expériences, la qualité de la lumière influerait sur la croissance des hypocotyles de BP par rapport à B en induisant un semi-nanisme et en particulier la lumière bleue (Noirot Comm. Pers). La mutation affecterait les récepteurs à la lumière bleue : les cryptochromes (Noirot Comm. Pers). Des plantules exposées à différents types de lumières pourraient être utilisées. La différence de composition en PPC en fonction de la variété (B ou BP) serait à étudier et en relation avec les teneurs en CAF et CQA.

## **III. Conclusion générale**

L'ensemble de ces recherches et de leurs développements ultérieurs éventuels ouvrent des perspectives sur l'amélioration et la maîtrise de la culture du café, de même que sur la gestion de la qualité de la tasse par le biais du taux de caféine et l'acide chlorogénique et donc du goût.

## Références bibliographiques

- Adler S, Verdeil J, Lartaud M, Fock-Bastide I, Joët T, Conéjéro G, & Noirot M (2014)** Morphological and histological impacts of the laurina mutation on fructification and seed characteristics in *Coffea arabica* L. *Trees*, 28(2), 585-595.
- Adzet T, & Puigmacia M (1985)** High-performance liquid chromatography of caffeoylquinic acid derivatives of *Cynara scolymus* L. leaves. *Journal of Chromatography*, 348, 447-453.
- Aerts R, & Baumann T (1994)** Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 45(273), 497-503.
- Ahmad M, Lin C, & Cashmore A (1995)** Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 8(5), 653-8.
- Akaffou D, Ky C, Barre P, Hamon S, Louarn J, & Noirot M (2003)** Identification and mapping of a major gene (Ft1) involved in fructification time in the interspecific cross *Coffea pseudozanguebariae* x *C. liberica* var. *Dewevrei*: impact on caffeine content and seed weight. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(8), 1486-90.
- Akaffou D, Konate I, Sié R, Poncet V, Zoro I, Keli J, Legnate H, et al. (2014)** Flowering phenology and yield-related traits in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* Bridson and *C. canephora* Pierre. *Australian Journal of Crop Science*, 8(9), 1272-1280.
- Alvim P (1973)** Factors affecting flowering of coffee. *Genes, Enzymes, and Populations* (pp. 193-202).
- Amorim H, Teixeira A, Guercio M, Cruz V, & Malavolta E (1974)** Chemistry of Brazilian green coffee and the quality of the beverage II phenolic compounds. *Turrialba*, 24(2), 217-221.
- Anthony F, Berthaud J, Guillaumet J, & Lourd M (1987)** Collecting wild *Coffea* species in Kenya and Tanzania. *Plant Genetic Resources newsletter*, 69, 23-29.
- Anthony F (1992)** Les ressources génétiques des caféiers : collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. *Travaux et Documents Microédités ORSTOM (France)*. (p. 320).
- Anthony F, Clifford M, & Noirot M (1993)** Biochemical diversity in the genus *Coffea* L. : chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 40, 61-70.
- Anthony F, Bertrand B, Quiros O, Wilches A, Lashermes P, Berthaud J, & Charrier A (2001)** Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica*, 118, 53-65.
- Anthony F, Combes C, Astorga C, Bertrand B, Graziosi G, & Lashermes P (2002)** The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(5), 894-900.
- Anthony F, & Lashermes P (2005)** Origin, evolution and diversity of coffee (*Coffea arabica* L.) genome. In: *Plant Genome, Biodiversity and Evolution*. Ed. by K.A Sharma and A. Sharma. Science Publishers Inc. Plymouth, UK. (pp. 208-228).
- Arendash G, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson E, Zacharia L, Cracchiolo J, Shippy D, et al. (2006)** Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain  $\beta$ -amyloid production. *Neuroscience*, 142, 941-952.

- Arendash G, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A, & Potter H (2009)** Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid- $\beta$  levels in aged Alzheimer's disease mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 17(3), 661–680.
- Ashihara H, Monteiro A, Gillies F, & Crozier A (1996)** Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant Physiology*, 111(3), 747–753.
- Ashihara H, Sano H, & Crozier A (2008)** Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, 69(4), 841–56.
- Aspinall G (1983)** The polysaccharides. in: (Ed.), *Molecular biology*, Academic Press, New York.
- Atalla R, Hackney J, Uhlin I, & Thompson N (1993)** Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15, 109–112.
- Baker D, & Ray P (1965)** Relation between effects of auxin on cell wall synthesis and cell elongation. *Plant Physiology*, 40(2), 360–8.
- Barre P, Akaffou D, Louarn J, Charrier A, Hamon S, & Noirot M (1998)** Inheritance of caffeine and heteroside contents in an interspecific cross between a cultivated coffee species *Coffea liberica* var *dewevrei* and a wild species caffeine-free *C. pseudozanguebariae*. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(2), 306–311.
- Baumann T, & Wanner H (1972)** Untersuchungen über den transport von kaffein in der kaffeepflanze *Coffea arabica*. *Planta*, 108, 11–19.
- Baumann T, & Gabriel H (1984)** Metabolism and excretion of caffeine during germination of *Coffea arabica* L. *Plant & Cell Physiology*, 25(8), 1431–1436.
- Baumann T, & Rohrig L (1989)** Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, 28(10), 2667–2669.
- Baumann T, Rodriguez M, & Kappeler A (1991)** Chlorogenic acid in leaf disks, suspension-cultured cells, and protoplasts of coffee (*Coffea arabica* L.). Physiological role and subcellular localization. In *COLLOQUE Scientifique International sur le Café*, 14. San Francisco (Estados Unidos), Juillet 14-19.
- Baumann T, Möslé S, Schulthess B, & Aerts R (1993)** Interdependence of caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) metabolism in coffee. *Proceedings of the 15th International Scientific Colloquium on Coffee*, Lomé, International Scientific Association on Coffee.
- Baumann T, Söndahl M, Möslé Waldhauser S, & Kretschmar J (1998)** Non-destructive analysis of natural variability in bean caffeine content of *Laurina* coffee. *Phytochemistry*, 49(6), 1569–1573.
- Baumann T (2006)** Some thoughts on the physiology of caffeine in coffee – and a glimpse of metabolite profiling. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 243–251.
- Beaudoin M, & Graham T (2011)** Methylxanthines and human health: epidemiological and experimental evidence. *Methylxanthines*. Springer Berlin Heidelberg. (pp. 509–548).
- Berthaud J (1986)** Les ressources génétiques pour l'amélioration des cafés africains diploïdes: évaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs: conséquences pour l'application. *Editions de l'ORSTOM*.
- Berthaud J, & Charrier A (1988)** *Genetic resources of Coffea* in Coffee vol.4, Agronomy. RJ Clarke & R. Macrae ed. Elsevier (Londres), p1-42.
- Beveridge C, Murfet I, Kerhoas L, Sotta B, Miginiac E, & Rameau C (1997)** The shoot control zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the blanching mutant rms4. *Plant Journal*, 11, 339–345.

- Billard A (1822)** *Voyages aux colonies orientales ou lettres écrites aux îles de France et de Bourbon pendant les années 1817-1820.*
- Bouharmont J (1959)** *Recherche sur les affinités chromosomiques dans le genre Coffea* (Bruselas (p. 94). Fra. (Serie Scientifique No. 77).
- Bouharmont J (1963)** Somatic chromosomes of some *Coffea* species. *Euphytica*, 12, 254–257.
- Boylan M, & Quail P (1991)** Phytochrome A overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 10806–10810.
- Bradbury A, & Halliday D (1990)** Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 389–392.
- Bradbury A (2001)** Chemistry I. Non-volatile compounds. Carbohydrates. In: *Clarke RJ, Vitzthum OG (eds) Coffee, recent developments. Blackwell Science, London* (pp. 3–6).
- Brett C, & Waldron K (1996)** Physiology and biochemistry of plant cell walls. in: *Black M & Charlwood B (eds) Topics in plant functional biology, Chapman & Hall, London, UK* (pp. 42–43).
- Bridson DM (1986)** Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). *Kew Bulletin*, 42, 453–460.
- Bridson D & Verdcourt B (1988).** *Coffea. Flora of tropical East Africa: Rubiaceae (part 2). Rotterdam: AA Balkema.* (pp. 703–723).
- Buckeridge M, Pessoa dos Santos H, & Tiné M (2000).** Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 141–156.
- Burg S, & Burg E (1967)** Inhibition of polar auxin transport by ethylene. *Plant Physiology*, 42, 1224–1228.
- Camacho-Cristóbal J, Anzellotti D, & González-Fontes A (2002)** Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 997–1002.
- Campa C, Noirot M, Bourgeois M, Pervent M, Ky C, Chrestin H, Hamon S, et al. (2003)** Genetic mapping of a caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase gene in coffee trees. Impact on chlorogenic acid content. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4), 751–6.
- Campa C, Ballester J, Doubeau S, Dussert S, Hamon S, & Noirot M (2004)** Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chemistry*, 88(1), 39–43.
- Campa C, Doubeau S, Dussert S, Hamon S, & Noirot M (2005)** Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild species. *Food Chemistry*, 93(1), 135–139.
- Campa C, Mondolot L, Rakotondravao A, Bidel L, Gargadennec A, Couturon E, La Fisca P, et al. (2012)** A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. *Annals of Botany*, 110(3), 595–613.
- Cannel M (1974)** Factors affecting *arabica* coffee bean size in Kenya. *Journal of Horticultural Science*, 49, 65–76.
- Cao C, Wang L, Lin X, Mamcarz M, Zhang C, Bai G, & Arendash G (2011)** Caffeine synergizes with another coffee component to increase plasma GCSF: linkage to cognitive benefits in Alzheimer's mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 25(2), 323–335.
- Carelli M, Lopes C, & Monaco L (1974)** Chlorogenic acid content in species of *Coffea* and selections of *arabica*. *Turrialba*, 24(4), 398–401.
- Carelli M, & Monaco L (1977)** Conservação de sementes de café racemosa. *Bragantia*, 36, 31–34.

- Carey A, Holt K, Picard S, Wilde R, Tucker G, Bird C, Schuch W, et al. (1995)** Tomato exo-(1->4)-[beta]-D-galactanase (isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit, and characterization of a related cDNA clone). *Plant Physiology*, 105, 1099–1107.
- Carpita NC, & Gibeaut DM (1993)** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 3(1), 1–30.
- Carvalho A (1946)** Distribuição geográfica e classificação botânica do genero *Coffea* com referencia especial a espécie *arabica*, 5: Origem e classificação botânica do *Coffea arabica* L. *Boletim da Superintendencia dos Servicos do Café*, 21(230), 174–184.
- Carvalho A, & Krug C (1949)** Agentes de polinização da flor do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Bragantia*, 9, 11–24.
- Carvalho A, & Krug C (1950)** Genetics of *Coffea* XIII. Inheritance of the erecta character in *C. arabica* L. *Bragantia*, 10, 321–328.
- Carvalho A, Medina Filho H, Fazuoli L, Guerreiro F, & Lima M (1991)** Aspectos genéticos do cafeeiro. *Revista Brasileira de Genética*, 14(1), 135–183.
- Catterou M, Dubois F, Schaller H, Aubanelle L, Vilcot B, Sangwan-Norreel B, & Sangwan R (2001)** Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the bull1 mutant. *Planta*, 212, 673–683.
- Cecy I, & Correa J (1984)** Hemicellulosic polymers from the leaves of *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, 23(6), 1271–1276.
- Charrier A (1972)** L'intercompatibilité des clones de caféiers cultivés sur la côte est Malgache. *Café Cacao Thé*, 2, 111–122.
- Charrier A, & Berthaud J (1975)** Variation de la teneur en caféine dans le genre *Coffea*. *Café Cacao Thé*, XIX(4), 251–264.
- Charrier A (1976)** *La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (Mascarocoffea): Leur relation avec les caféiers d'origine africaine (Eucoffea)* (p. 224).
- Charrier A, Lanaud C, & Guillet J (1978)** Etude de la variabilité des descendances issues de pollinisations libres et contrôlées à Madagascar. *Café Cacao Thé*, 14, 89–98.
- Chaves J, Miyazawa M, & Bloch M (2004)** Estimativa do teor de cafeína nas sementes de café baseada na sua concentração nas folhas de mudas e de plantas adultas. *Maringá*, 26, 287–292.
- Chen C, & Kristopit S (1981)** Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiology*, 68, 1020–1023.
- Chevalier A, & Dagron M (1928)** Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique. *Communications et Actes de l'Académie des Sciences Coloniales, Paris*.
- Chevalier A (1947)** Les caféiers du globe, fasc. 3: systématique des caféiers et faux-caféiers maladies et insectes nuisibles. *Encyclopédie Biologique*.
- Clifford M, & Staniford P (1977)** A critical comparison of six spectrophotometric methods for measuring chlorogenic acids in green coffee beans. *Proceedings of the 8th International Scientific Colloquium on Coffee, Abidjan, Ivory Coast; ASIC: Paris* (pp. 109–113).
- Clifford M (1979)** Chlorogenic acids: their complex nature and routine determination in coffee beans. *Food Chemistry*, 4, 63–71.
- Clifford M (1985)** Chlorogenic Acids. *Coffee*, 153–202.
- Clifford M, & Willson K (1985)** Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage* (pp. 305–374).

- Clifford M, Willson K, Smith R, Charrier A, Berthaud J, Van der Vossen H, Cannell M, et al. (1985)** *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*.
- Clifford M, & Kazi T (1987)** The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. *Food Chemistry*, 26(1), 59–69.
- Clifford M, & Jarvis T (1988)** The chlorogenic acids content of green robusta coffee beans as a possible index of geographic origin. *Food Chemistry*, 29, 291–298.
- Clifford M, Williams T, & Bridson D (1989)** Chlorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in *Coffea* and *Psilanthus*. *Phytochemistry*, 28(3), 829–838.
- Clifford M, & Ramirez-Martinez J (1991)** Phenols and Caffeine in Wet-Processed Coffee Beans and Coffee Pulp. *Food Chemistry*, 40, 35–42.
- Clifford M (2000)** Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1033–1043.
- Conéjéro G, Noirot M, Talamond P, & Verdeil J-L (2014)** Spectral analysis combined with advanced linear unmixing allows for histolocalization of phenolics in leaves of coffee trees. *Frontiers in Plant Science*.
- Cosgrove D (2005)** Growth of the plant cell wall. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–61.
- Coulibaly I, Noirot M, Lorieux M, Charrier A, Hamon S, & Louarn J (2002)** Introgression of self-compatibility from *Coffea heterocalyx* to the cultivated species *Coffea canephora*. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6-7), 994–999.
- Cowling R, & Harberd N (1999)** Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. *Journal of Experimental Botany*, 50(337), 1351–1357.
- Cros J, Combes M, Chabrilange N, Duperray C, Monnot des Angles A, & Hamon S (1995)** Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (Rubiaceae): inter- and intra-specific variation in African species. *Canadian Journal of Botany*, 73(1), 14–20.
- Cros J, Combes M, Trouslot P, Anthony F, Hamon S, Charrier A, & Lashermes P (1998)** Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9(1), 109–117.
- Cummins W, Kende H, & Raschke K (1971)** Specificity and reversibility of the rapid stomatal response to abscisic acid. *Planta*, 99, 347–351.
- Da Silva E, Toorop P, Van Aelst A, & Hilhorst H (2004)** Absciscic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta*, 220(2), 251–61.
- Da Silva E, Toorop P, Nijse J, Bewley J, & Hilhorst H (2005)** Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. *Journal of Experimental Botany*, 56(413), 1029–38.
- Da Silva E, Toorop P, Van Lammeren A, & Hilhorst H (2008)** ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* “Rubi”) seed germination. *Annals of Botany*, 102(3), 425–33.
- Darvill A, & McNeil M (1980)** The primary cell walls of flowering plants. In NE Tolbert, ed, *The Biochemistry of Plants, Vol I*. Academic Press, New York, (pp. 91–162).
- Davis A (2003)** A new combination in *Psilanthus* (Rubiaceae) for Australasia, and nomenclatural notes on *Paracoffea*. *Novon*, 13, 182–184.



- Davis A., Bridson D., & Rakotonasolo F (2005)** A reexamination of *Coffea* subgenus *BaraCoffea* and comments on the morphology and classification of *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae-Coffeeae). *Monograph in Systematic Botany* (pp. 398–420).
- Davis A, Tosh J, Ruch N, & Fay M (2011)** Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 167, 357–377.
- De Candolle A (1883)** Origine des plantes cultivées. *Germer-Baillière*.
- De Castro R, Estanislau W, Mesquita P, & Hilhorst H (2001)** A semante de café: desenvolvimento e perspectivas genômicas. *II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil* (pp. 253–260).
- De Castro R, Estanislau W, Carvalho M, & Hilhorst H (2004)** Functional development and maturation of coffee (*Coffea arabica*) fruits and seeds. *Proceedings of the 20th International Scientific Colloquium on Coffee, Bangalore, International Scientific Association on Coffee, Paris2* (pp. 619–635).
- De Castro R, & Marraccini P (2006)** Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 175–199.
- De Reffye P (1974)** Le contrôle de la fructification et de ses anomalies chez les *Coffea arabica*, robusta et leurs hybrides Arabusta. *Café Cacao Thé*, 18(4), 237–254.
- De Toledo P (1961)** Estrutura anatomica do fruto de café. *Bragantia*, 20, 53–61.
- De Villèle A (1920)** L'origine du café Leroy ou [Bourbon] pointu. *Revue agricole, Archives de la chambre d'Agriculture, Saint Denis (Réunion)* (pp. 404–406).
- Dedecca D (1957)** Anatomia e desenvolvimento ontogenetico de *Coffea arabica* L. var. *typica* cramer. *Bragantia*, 16(23).
- Denoeud F, Carretero-Paulet L, Dereeper A, Droc G, Guyot R, Pietrella M, Zheng C, et al (2014)** The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, 345(6201), 1181–1184.
- Dentan E (1977)** Structure fine du grain de café vert. *8th International Scientific Colloquium on Coffee, Abidjan. Association Scientifique Internationale du Café, Paris* (pp. 59–64).
- Dentan, E. (1985).** Etude microscopique du développement et de la maturation du grain de café. *Proceedings of the 11th International Scientific Colloquium on Coffee, Lomé, International Scientific Association on Coffee, Paris* (pp. 381–398).
- Dolezel J, Sgorbati S, & Lucretti S (1992)** Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85, 625–631.
- Dong Q, & Fang J (2000)** Characterization of polysaccharides from the roots of *Sophora subprostrata*. *Zhongguo Yao Xue Za Zhi*, 36, 85–87.
- Dussert S, Chabrillange N, Engelmann F, Anthony F, Louarn J, & Hamon S (2000)** Relationship between seed desiccation sensitivity, seed water content at maturity and climatic characteristics of native environments of nine *Coffea* L. species. *Seed Science Research*, 10, 293.
- El Hamidi A, & Wanner H (1964)** The distribution pattern of chlorogenic acid and caffeine in *Coffea arabica*. *Planta*, 96, 90–96.
- Fagerlind F (1939)** Perisperm oder endosperm bei *Coffea*. *Svensk Bot. Tidskr*, 33, 303–309.
- Farah A, Monteiro M, & Trugo L (2005)** Distribuição de ácidos clorogênicos nos principais defeitos do café. *Annals of the IV Simpósio de PNP&D Embrapa Café. Londrina, P.R., Brazil*.
- Ferrier W (1960)** The crystal structure of  $\beta$ -D-glucose. *Acta Crystallographica*, 13, 678.

- Fischer M, Reimann S, Trovato V, & Redgwell R (1999)** Structural aspects of polysaccharides from *Arabica* coffee. *ASIC*.
- Fischer M, Reimann S, Trovato V, & Redgwell R (2001)** Polysaccharides of green *Arabica* and Robusta coffee beans. *Carbohydrate Research*, 330(1), 93–101.
- Fleming T, & Heithaus E (1981)** Frugivorous bats, seed shadows, and the structure of tropical forests. *Biotropica*, 45–53.
- Friedman J, & Waller G (1983)** Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 9(8), 1099–1106.
- Frischknecht P, Ulmer-Dufek J, & Baumann T (1986)** Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: Expression of an optimal defence strategy? *Phytochemistry*, 25(3), 613–616.
- Gajdosová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev P, Galuszka P, et al. (2011)** Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2827–40.
- Galbraith D, Harkins K, Maddox J, Ayres N, Sharma D, & Firoozabady E (1983)** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220, 1049–1051.
- Gao S, & Nishinari K (2004)** Effect of deacetylation rate on gelation kinetics of konjac glucomannan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 38(3-4), 241–9.
- Gautier-Hion A, Duplantier J, Quris R, Feer F, Sourd C, Decoux J, Dubost G, et al. (1985)** Fruit characters as a basis of fruit choice and seed dispersal in a tropical forest vertebrate community. *Oecologia*, 65, 324–337.
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, & Höfte H (1997)** Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 114(1), 295–305.
- Gillies F, Jenkins G, Ashihara H, & Crozier A (1995)** In vitro biosynthesis of caffeine: the stability of N-methyltransferase activity in cell-free preparations from liquid endosperm of *Coffea arabica*. *Proceedings of the 16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto*, (pp. 599–605).
- Giorgini J, & Campos C (1992)** Changes in the content of soluble sugars and starch synthesis and degradation during germination and seedling growth of *Coffea arabica* L. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 4(1), 11–15.
- Govaerts R, Ruhsam M, Andersson L, Robbrecht E, Bridson D, Davis A, Schanzer I, et al. (2011)** World checklist of *Rubiaceae*. *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew*.
- Graner E (1936)** Megasporogenesis in *Coffea arabica* L. *Arq. Inst. Biol. Veg. Rio de Janeiro*, 3, 69.
- Graner E (1938)** Embriogênese de *Coffea*. I. Desenvolvimento do óvulo em *Coffea arabica* L. *Reunião sul-americana de Botânica* (Vol. 1, pp. 193–202).
- Grassias M, & Kammacher P (1975)** Observations sur la conjugaison chromosomique de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé*, 19(3), 177–190.
- Griffiths D, & Bain H (1997)** Photo-induced changes in the concentrations of individual chlorogenic acid isomers in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and their complexation with ferric ions. *Potato Research*, 40, 307–315.
- Grishutin S, Gusakov A, Markov A, Ustinov B, Semenova M, & Sinitsyn A (2004)** Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674(3), 268–81.
- Guerrero G, Suárez M, & Moreno G (2001)** Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2454–8.

- Guyot B, Gueule D, Manez J, Perriot J, Giron J, & Villain L (1996)** Influence de l'altitude et de l'ombrage des cafés *Arabica*. *Plantations Recherche Développement*, 3, 272–280.
- Haarer A (1956)** *Modern coffee production*. Leonard Hill. Limited, London. (p. 467).
- Hahlbrock K, & Scheel D (1989)** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual review of plant biology*, 40, 347–369.
- Hallé F, & Oldeman R (1970)** *Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux*.
- Hanson K (1965)** Chlorogenic acid biosynthesis. Chemical synthesis and properties of the mono-O-cinnamoylquinic acids. *Biochemistry*, 4(12), 2719–2731.
- Hilhorst H, & Karssen C (1992)** Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulation*, 11(3), 225–238.
- Hoch G (2007)** Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. *Functional Ecology*, 21, 823–834.
- Hoffmann-Benning S, & Kende H (1992)** On the role of abscisic acid and gibberellin in the regulation of growth in rice. *Plant Physiology*, 99(3), 1156–61.
- Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P, & Legrand M (2003)**. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 95–103.
- Horman I, & Viani R (1972)** The nature and conformation of caffeine-chlorogenate complex of coffee. *Journal of Food Science*, 37, 925–927.
- Howles P, Sewalt V, Paiva N, Elkind Y, Bate N, Lamb C, & Dixon R (1996)** Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology*, 112(4), 1617–1624.
- Huxley P (1964)** Some factors which can regulate germination and influence viability of coffee seeds. *Proceedings International Seed Testing Association*, 29(1), 33–60.
- Illy A, & Viani R (1995)** *Espresso coffee. The chemistry of quality*. Academic Press, London (pp. 5–7).
- Jacobsen J (1984)** The seed: germination. In *Embryology of Angiosperms* (pp. 611–646).
- Joersbo M, Marcussen J, & Brunstedt J (2001)** In vivo modification of the cell wall polysaccharide galactomannan of guar transformed with a  $\alpha$ -galactosidase gene cloned from senna. *Molecular Breeding*, 7, 211–219.
- Joët T, Laffargue A, Salmona J, Doulebeau S, Descroix F, Bertrand B, De Kochko A, et al. (2009)** Metabolic pathways in tropical dicotyledonous albuminous seeds: *Coffea arabica* as a case study. *The New Phytologist*, 182(1), 146–62.
- Joët T, Laffargue A, Descroix F, Doulebeau S, Bertrand B, De Kochko A, & Dussert S (2010)** Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green *Arabica* coffee beans. *Food Chemistry*, 118(3), 693–701.
- Joët T, Salmona J, Laffargue A, Descroix F, & Dussert S (2010)** Use of the growing environment as a source of variation to identify the quantitative trait transcripts and modules of co-expressed genes that determine chlorogenic acid accumulation. *Plant, Cell & Environment*, 33(7), 1220–33.
- Jones L, Milne J, Ashford D, & McQueen-Mason S (2003)** Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11783–8.
- Joshi A (1938)** A note on morphology of the ovule of Rubiaceae with special reference to cinchona and coffee. *Current Science*, 7(5), 236–237.

- Kacurakova M, Capek P, Sasinkova V, Wellner N, & Ebringerova A (2000)** FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43, 195–203.
- Kalberer P (1965)** Breakdown of caffeine in the leaves of *Coffea arabica* L. *Nature*, 205, 597–598.
- Kappeler A, Baumann T, & Greutert H (1987)** Complexation of purine alkaloids in the coffee plant. *Proceedings of the International Congress of ASIC* (pp. 247–253).
- Kawamura H, Kamisaka S, & Masuda Y (1976)** Regulation of lettuce hypocotyl elongation by gibberellic acid. Correlation between cell elongation, stress-relaxation properties of the cell wall and wall polysaccharide content. *Plant & Cell Physiology*, 17, 23–34.
- Keller H, Wanner H, & Baumann T (1972)** Kaffeinsynthese in früchten und gewebeukuhren *Coffea arabica*. *Planta*, 108, 339–350.
- Kihlman B, Sturelid S, Hartley-Asp B, & Nilsson K (1974)** The enhancement by caffeine of the frequencies of chromosomal aberrations induced in plant and animal cells by chemical and physical agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 26(2), 105–122.
- Kim J, & Carpita N (1992)** Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiology*, 98(2), 646–653.
- Koshiro Y, Zheng X, Wang M, Nagai C, & Ashihara H (2006)** Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. *Plant Science*, 171(2), 242–250.
- Koshiro Y, Jackson M, Katahira R, Wang M, Nagai C, & Ashihara H (2007)** Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. *Journal of Biosciences*, 62(9-10), 731–42.
- Krug C, & Carvalho A (1946)** Genetica de *Coffea*, 6.
- Krug C (1949)** Mutações em *Coffea arabica* L. *Bragantina*, 9(1-4).
- Krug C, & Carvalho A (1951)** The genetics of *Coffea*. *Adv genet*, 4, 127–158.
- Krug C, Carvalho A, & Filho H (1954)** Genética de *Coffea*. XXI. Hereditariedade dos característicos de *Coffea arabica* L. var *Laurina* (Smeathman) DC. *Bragantina*, 13(21).
- Kudo T, Kiba T, & Sakakibara H (2010)** Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 53–60.
- Kudo T, Makita N, Kojima M, Tokunaga H, & Sakakibara H (2012)** Cytokinin activity of cis-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative cis-Zeatin-O-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiology*, 160(1), 319–31.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, et al. (2007)** Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128), 652–5.
- Kutschera U, & Niklas K (2013)** Cell division and turgor-driven stem elongation in juvenile plants: a synthesis. *Plant Science*, 207, 45–56.
- Kwon S, Lee H, Kim J, Hong S, Kim H, Jo T, Park Y, et al. (2010)** Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*, 649(1-3), 210–7.
- Ky C, & Louarn J (1999)** Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var *dewevrei*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 628–637.

- Ky C, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, & Noirot M (2001)** Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75(2), 223–230.
- Ky C, Barre P, & Noirot M (2013)** Genetic investigations on the caffeine and chlorogenic acid relationship in an interspecific cross between *Coffea liberica dewevrei* and *C. pseudozanguebariae*. *Tree Genetics & Genomes*, 9(4), 1043–1049.
- Lashermes P, Combes M, Trouslot P, & Charrier A (1997)** Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 947–955.
- Lashermes P, Combes M, Robert J, Trouslot P, D'Hont A, Anthony F, & Charrier A (1999)** Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular & General Genetics: MGG*, 261(2), 259–66.
- Lécolier A, Noirot M, Escoute J, Chrestin H, & Verdeil J (2009a)** Early effects of the mutation *laurina* on the functioning and size of the shoot apex in coffee tree and analysis of the plastochron phases: relationships with the dwarfism of leaves. *Trees*, 23(3), 673–682.
- Lécolier A, Besse P, Charrier A, Tchakaloff T, & Noirot M (2009b)** Unraveling the origin of *Coffea arabica* “Bourbon pointu” from La Réunion: a historical and scientific perspective. *Euphytica*, 168(1), 1–10.
- Lécolier A, Verdeil J, Escoute J, Chrestin H, & Noirot M (2009c)** *Laurina* mutation affected *Coffea arabica* tree size and shape mainly through internode dwarfism. *Trees*, 23(5), 1043–1051.
- Leliveld J (1938)** Vruchtzetting bij koffie.
- Leon J, & Fournier L (1962)** Crecimiento y desarrollo del fruto de *Coffea arabica* L. *Turrialba*, 12, 65–74.
- Leroy J (1961)** Sur deux caféiers remarquables de la forêt sèche du Sud-Ouest de Madagascar (*C. Humbertii* J.F. Ler. et *C. Capuronii* J.F. Ler.). *Coffea. C R Acad Sci Paris*, 252, 2285–2287.
- Leroy J (1980)** Evolution et taxogenèse chez les caféiers (*Coffea* L., *Psilanthus* Hook. f. et *Nostolachma* Durand). Hypothèse sur leur origine. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*.
- Lima R, Dos Santos T, Vieira L, Ferrarese M, Ferrarese-Filho O, Donatti L, Boeger M, et al. (2013)** Heat stress causes alterations in the cell-wall polymers and anatomy of coffee leaves (*Coffea arabica* L.). *Carbohydrate polymers*, 93(1), 135–43.
- Louarn J (1972)** Introduction a l'étude gentique des Mascaroffea: Nouvelles determinations de leurs nombres chromosomiques. *Café Cacao Thé*, 16, 312–315.
- Louarn J (1992)** La fertilité des hybrides interspécifiques et les relations génomiques entre caféiers diploïdes d'origine africaine (Genre *Coffea* L. sous-genre *Coffea*).
- Lulsdorf M, Yuan H, Slater S, Vandenberg A, Han X, Zaharia L, & Abrams S (2013)** Endogenous hormone profiles during early seed development of *C. arietinum* and *C. anatolicum*. *Plant Growth Regulation*, 71(2), 191–198.
- MacDougal D (1903)** The influence of light and darkness upon growth and development. *New York Botanical Garden*, 2.
- Maestri M, & Vieira C (1961)** Nota sobre a reducao da porcentagem de germinacao de sementes de café (*Coffea arabica* L. var. *Bourbon*) por efeito do ácido giberélico. *Revista Ceres*, 11(65), 247–249.
- Mahesh V, Rakotomalala J, Le Gal L, Vigne H, De Kochko A, Hamon S, Noirot M, et al. (2006)** Isolation and genetic mapping of a *Coffea canephora* phenylalanine ammonia-lyase gene

- (CcPALI) and its involvement in the accumulation of caffeoyl quinic acids. *Plant Cell Reports*, 25(9), 986–92.
- Maier H (1987)** The acids of coffee. *Proc Int Congr ASIC* (pp. 229–237).
- Martienssen R (1996)** Epigenetic phenomena: paramutation and gene silencing in plants. *Current biology*, 6(7), 810–3.
- Masuda Y (1990)** Auxin-induced cell elongation and cell wall changes. *The Botanical Magazine Tokyo*, 103(3), 345–370.
- Maurin O, Davis A, Chester M, Mvungi E, Jaufeerally-Fakim Y, & Fay M (2007)** Towards a Phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany*, 100(7), 1565–83.
- Mazzafera P, & Magalhaes A (1991)** Cafeína em folhas e sementes de espécies de *Coffea* e *Paracoffea*. *Revista Brasileira de Botânica*, 14, 157–160.
- Mazzafera P, Crozier A, & Sandberg G (1994)** Studies on the metabolic control of caffeine turnover in developing endosperms and leaves of *Coffea arabica* and *C. dewevrei*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 1423–1427.
- Mazzafera P, Silvarolla M, Lima M, & Medina Filho H (1997)** Caffeine content of diploid coffee species. *Ciênc. cult. (São Paulo)*, 49(3), 216–218.
- Mazzafera P, & Gonçalves K (1999)** Nitrogen compounds in the xylem sap of coffee. *Phytochemistry*, 50, 383–386.
- McCann M, Wells B, & Roberts K (1990)** Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science*, 96, 323–334.
- McCartney L, Marcus S, & Knox J (2005)** Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(4), 543–546.
- McGaw B, Horgan R, & Heald J (1985)** Cytokinin metabolism and the modulation of cytokinin activity in radish. *Phytochemistry*, 24, 9–13.
- Medina D (1964)** O endosperma de café como material para estudos citológicos. *Bragantia*, 23(16), 179–186.
- Medina D (1965)** Novas observações citológicas no endosperma de café. *Bragantia*, 24(29), 369–384.
- Medina Filho H, Carvalho A, Söndahl M, Fazuoli L, & Costa W (2011)** Coffee breeding and related evolutionary aspects. *Plant Breeding Reviews*, 2.
- Mendes A (1941)** Cytological observations in *Coffea*. VI. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. *American Journal of Botany*.
- Mendes A (1942)** Observacoes citologicas em *Coffea*. Desenvolvimento do embriao e do endosperma em *C. arabica*. *Bragantina*, 2, 115–128.
- Meyer Y, & Cooke R (1979)** Time course of hormonal control of the first mitosis in tobacco mesophyll protoplasts cultivated in vitro. *Planta*, 147(3), 181–5.
- Milić B, Stojanović S, Vučurević N, & Turčić M (1968)** Chlorogenic and quinic acids in sunflower meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19(2), 108–113.
- Miller C, Skoog F, Von Saltza M, & Strong F (1955)** Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 1392.
- Mizuno K, Okuda A, Kato M, Yoneyama N, Tanaka H, Ashihara H, & Fujimura T (2003)** Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS letters*, 534, 75–81.

- Moisyadi S, Neupane K, & Stiles J (1998)** Cloning and characterization of a cDNA encoding xanthosine-N7-methyltransferase from coffee (*Coffea arabica*). In *International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Part 2* 461, (461), 367–377.
- Moisyadi S, Neupane K, & Stiles J (1999)** Cloning and characterization of xanthosine-N7-methyltransferase, the first enzyme of the caffeine biosynthetic pathway. *Proceedings of the 18th International Scientific Colloquium on Coffee. Association Scientifique Internationale du Café* (pp. 327–331).
- Mok M, Mok D, & Armstrong D (1978)** Differential cytokinin structure-activity relationship in *Phaseolus*. *Plant Physiology*, 61, 72–75.
- Monaco L, & Carvalho A (1963)** Coffee breeding: XXVI-Productivity of inbred lines and the in hybrids of the cultivar 'bourbon vermelho'. *Bragantia*, 22, 117–124.
- Mondolot L, La Fisca P, Buatois B, Talansier E, De Kochko A, & Campa C (2006)** Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Annals of Botany*, 98(1), 33–40.
- Muschler R (2001)** Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee-zone of Costa Rica. *Agroforestry Systems*, 85, 131–139.
- Mösli Waldhauser S, & Baumann T (1996)** Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry*, 42(4), 985–996.
- Nehlig A, Daval J, & Debry G (1992)** Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 17, 139–170.
- Nevins D, English P, & Albersheim P (1968)** Changes in cell wall polysaccharides associated with growth. *Plant Physiology*, 43(6), 914–22.
- Noirot M, Poncet V, Barre P, Hamon P, Hamon S, & De Kochko A (2003)** Genome size variations in diploid African *Coffea* species. *Annals of Botany*, 92(5), 709–14.
- Nunes F, & Coimbra M (2001)** Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted *arabica* coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1773–82.
- Nunes F, Reis A, Silva A, Domingues M, & Coimbra M (2008)** Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans. *Phytochemistry*, 69(7), 1573–85.
- Ogawa M, Herai Y, Koizumi N, Kusano T, & Sano H (2001)** 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants: gene isolation and enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8213–8218.
- Oosterveld A, Harmsen J, Voragen A, & Schols H (2003)** Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. *Carbohydrate Polymers*, 52(3), 285–296.
- Oosterveld A, Coenen G, Vermeulen N, Voragen A, & Schols H (2004)** Structural features of acetylated galactomannans from green beans. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 427–434.
- O'Neill M, & York W (2003)** *The plant cell wall*. ed. Rose JKC, Blackwell, Oxford. (pp. 1–54).
- Payen A (1846)** Premier mémoire sur le café. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*.
- Perrois C, Strickler S, Mathieu G, Lepelley M, Bedon L, Michaux S, Husson J, et al. (2014)** Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (*Arabica*) and *Coffea canephora* (*Robusta*). *Planta*, 1–13.

- Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, Janiak V, et al. (2009)** Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(15-16), 1663–79.
- Pettolino F, Hoogenraad N, Ferguson C, Bacic A, Johnson E, & Stone B (2001)** A (1-4)- $\beta$ -mannan-specific monoclonal antibody and its use in the immunocytochemical location of galactomannans. *Planta*, 214(2), 235–42.
- Pfrunder R, Wanner H, Frischknecht P, & Baumann T (1980)** An attempt to localize caffeine in the cell by its washout kinetics. *COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 9. Londres (Inglaterra)*.
- Piccino S (2011)** Rôle des constituants chimiques du café vert, du terroir et des traitements post-récolte sur la qualité aromatique du “Bourbon Pointu.”
- Pineda R, Brugière N, Vankova M, Malbeck J, Olson J, Haines S, Martin R, et al. (2008)** Overexpression of a zeatin O-glucosylation gene in maize leads to growth retardation and tasselseed formation. *Journal of Experimental Botany*, 59, 2673–2686.
- Portères R (1946)** L’atrophie florale non parasitaire chez les Caféiers et les causes physiologiques. *Revue internationale de botanique appliquée et d’agriculture tropicale*, 281-282, 111–119.
- Qin Y, & Zhao J (2007)** Localization of arabinogalactan-proteins in different stages of embryos and their role in cotyledon formation of *Nicotiana tabacum* L. *Sexual Plant Reproduction*, 20(4), 213–224.
- Rakotomalala J, Cros E, Charrier A, Anthony F, & Noirot M (1993)** Marqueurs biochimiques de la diversité des caféiers. *COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 15. Montpellier (France)*.
- Ramaiah P, & Vasudeva N (1969)** Observations on the growth of coffee berries in South India. *Turrialba*, 19, 544–564.
- Ranjeva R, Alibert G, & Boudet A (1977)** Métabolisme des composés phénoliques chez le pétunia. IV. Intervention des chloroplastes dans la biosynthèse de la naringénine et de l’acide chlorogénique. *Plant Science Letters*, 10, 235–242.
- Raoul E (1897)** *Culture du caféier. Semis, plantations, taille, cueillette, dépulpation, décorticage, expédition, commerce, espèces et races.*
- Redgwell R, Curti D, Fischer M, Nicolas P, & Fay L (2002)** Coffee bean arabinogalactans: acidic polymers covalently linked to protein. *Carbohydrate Research*, 337(3), 239–53.
- Redgwell R, Trovato V, Curti D, & Fischer M (2002)** Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in *Arabica* coffee beans. *Carbohydrate Research*, 337(5), 421–31.
- Redgwell R, Curti D, Rogers J, Nicolas P, & Fischer M (2003)** Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea arabica* L.) development: implications for in vivo modification of galactomannan synthesis. *Planta*, 217(2), 316–26.
- Redgwell R, & Fischer M (2006)** Coffee carbohydrates. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 165–174.
- Redig P, Shaul O, Inze D, Van Montagu M, & Van Onckelen H (1996)** Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS letters*, 391, 175–80.
- Reid J, & Meier H (1973)** Enzymic activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. *Leguminosae*). *Planta*, 112, 301–308.
- Rhodes M, & Woollorton L (1976)** The enzymic conversion of hydroxycinnamic acids to *p*-coumarylquinic and chlorogenic acids in tomato fruits. *Phytochemistry*, 15, 947–951.



- Ridley B, O'Neill M, & Mohnen D (2001)** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929–967.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqmard A, & Murray J (1999)** Cytokinin Activation of Arabidopsis Cell Division Through a D-Type Cyclin. *Science*, 283, 1541–1544.
- Roland J (1980)** Visualisation des polysaccharides au niveau ultrastructural. *Polymères Végétaux. Polymères Pariétaux et Alimentaires non azotés*. Costes C. et Monties B., Paris, Francia, (pp. 30–45).
- Sakamura S, & Obata Y (1963)** Anthocyanase and anthocyanins occurring in eggplant, *Solanum melongena* L. Part II. Isolation and identification of chlorogenic acid and related compounds from eggplant. *Agricultural and Biological Chemistry*, 27(2), 121–127.
- Salmona J, Dussert S, Descroix F, De Kochko A, Bertrand B, & Joët T (2008)** Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. *Plant Molecular Biology*, 66(1-2), 105–24.
- Santos H, & Buckeridge M (2004)**. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany*, 94(6), 819–30.
- Schmitz R, Skoog F, Hecht S, Bock R, & Leonard N (1972)** Comparison of cytokinin activities of naturally occurring ribonucleosides and corresponding bases. *Phytochemistry*, 11, 1603–1610.
- Seifert G, & Roberts K (2007)** The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 137–161.
- Selvendran R, Stevens B, & O'Neill M (1985)** Developments in the isolation and analysis of cell walls from edible plants. *Biochemistry of Plant Cell Walls*, 39–78.
- Shadaksharaswamy M, & Ramachandra G (1968)** Acid soluble polysaccharide of coffee seeds. *Current Science*, 20, 583–584.
- Shallom D, & Shoham Y (2003)** Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 219–228.
- Silvarolla M, Mazzafera P, De Lima M, Medina Filho H, & Fazuoli L (1999)**. Ploidy level and caffeine content in leaves of *Coffea*. *Scientia Agricola*, 56(3).
- Smigocki A, & Owens L (1989)** Cytokinin-to-auxin ratios and morphology of shoots and tissues transformed by a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Physiology*, 91, 808–811.
- Smith R (1963)** Les acides chlorogéniques du café. *Café Cacao Thé*, 7(3).
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, et al. (2004)** Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5705), 2206–11.
- Somerville C (2006)** Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 53–78.
- Söndahl M, & Baumann T (2001)**. *Agronomy II: Developmental and cell biology*. In: Clarke RJ and Vitzthum OG (Eds) *Coffee: Recent Developments*, Blackwell Science, Oxford (pp. 202–223).
- Sondheimer E, Covitz F, & Marquisee M (1961)** Association of naturally occurring compounds, the chlorogenic acid-caffeine complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93, 63–71.
- Sondheimer E (1964)** Chlorogenic acids and related depsides. *The Botanical Review*, 30(4), 667–712.
- Sondheimer E, & Tzou D (1971)** The metabolism of hormones during seed germination and dormancy II. The metabolism of 8-14C-zeatin in bean axes. *Plant Physiology*, 47, 516–520.

- Speer K, & Kölling-speer I (2006)** The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 201–216.
- Srinivasan C, Suryakantha Raju K, & Vishveshwara S (1978)** Pattern of fruit growth and development in inter-specific hybrids of *Coffea canephora* X *C. arabica*. *Indian Coffee*, 120–125.
- Srivastava L, Sawhney V, & Taylor I (1975)** Gibberellic-Acid-induced cell elongation in lettuce hypocotyls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(3), 1107–11.
- Stebbins G (1958)** The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Advances in genetics*, 9, 147–215.
- Stoffelen P, Noirot M, Couturon E, Bontems S, De Block P, & Anthony F (2009)** *Coffea anthonyi*, a new self-compatible Central African coffee species, closely related to an ancestor of *Coffea arabica*. *Taxon*, 133–140.
- Streuli H (1970)** Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewurze. In: *Schormuller J (ed) Kaffee*. Springer Berlin Heidelberg New York (p. 55).
- Stuart D, Durnam D, & Jones R (1977)** Cell elongation and cell division in elongating lettuce hypocotyl sections. *Planta*, 135, 249–255.
- Sutherland P, Hallett I, MacRae E, Fischer M, & Redgwell R (2004)** Cytochemistry and immunolocalisation of polysaccharides and proteoglycans in the endosperm of green *Arabica* coffee beans. *Protoplasma*, 223(2-4), 203–11.
- Suttle J, & Banowetz G (2000)** Changes in cis-zeatin and cis-zeatin riboside levels and biological activity during potato tuber dormancy. *Physiologia Plantarum*, 109, 68–74.
- Sybenga J (1960)** Genetica y citologia del café. Una revision de literatura. *Turrialba*, 10(3), 83–137.
- Sylvain P (1955)** Some observations on *Coffea arabica* L. in Ethiopia. *Turrialba*, 5, 37–53.
- Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, et al. (1996)** Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell*, 85(2), 171–82.
- Takahama U (1998)** Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Physiology*, 39(7), 681–689.
- Tango J, & Carvalho A (1963)** Teor de óleo e de cafeína em variedades de café. *Bragantia*, 22, 793–797.
- Thaler H, & Arneth W (1968)** Investigations in coffee and coffee substitutes. IX. The polysaccharides of *Coffea arabica* green beans. *Z. Lebensm.-Untersuch.-Forsch*, 138, 26–35.
- Thomas A (1942)** The wild *arabica* coffee on the Boma Plateau, Anglo-Egyptian Sudan. *Empire J Expt Agric*, 10, 207–212.
- Tokunaga H, Kojima M, Kuroha T, Ishida T, Sugimoto K, Kiba T, & Sakakibara H (2012)** *Arabidopsis* lenely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant Journal*, 69, 355–365.
- Uefuji H, Ogita S, Yamaguchi Y, Koizumi N, & Sano H (2003)** Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant Physiology*, 132(May), 372–380.
- Vaast P, Bertrand B, Perriot J, Guyot B, & Génard M (2006)** Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2), 197–204.

- Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn S, Liu Z, Zhai H, Sørle M, & Eijsink V (2010)** An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6001), 219–22.
- Valio I (1976)** Germination of Coffee Seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). *Journal of Experimental Botany*, 27(100), 983–991.
- Valio I. (1980)** Inhibition of germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) by the endocarp. *Journal of Seed Technology*, 5(1), 32–39.
- Vanderhoef L, & Dute R (1981)** Auxin-regulated wall loosening and sustained growth in elongation. *Plant Physiology*, 67, 146–149.
- Vincken J, Schols H, Oomen R, Mccann M, Ulvskov P, Voragen A, & Visser R (2003)** If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132, 1781–1789.
- Vince D (1964)** Photomorphogenesis in plant stems. *Biological Reviews*, 39(4), 506–533.
- Vishveshwara S, & Chinnappa C (1965)** Embryological studies in *Coffea arabica* L. *Turrialba*, 15, 307–316.
- Voragen A, Pilnik W, Thibault J, Axelos M, & Renard C (1995)** Pectins. In: Stephen AM (Ed.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 287–339).
- Wellman F (1961)** *Coffee: botany, cultivation, and utilization*. (p. 488).
- Went F (1957)** The experimental control of plant growth. *Earhart Plant Research Laboratory at the California Institute of Technology*. (p. 343).
- Whitney S, Gothard M, Michell J, & Gidley M (1999)** Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiology*, 121, 657–664.
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, & Knox J (2001)**. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Cell Walls*, 9–27.
- Withrow R (1941)** Response of seedlings to various wavebands of low intensity irradiation. *Plant Physiology*, 16(2), 241.
- Wolfrom M, Plunkett R, & Laver M (1960)** Coffee constituents, carbohydrates of the coffee bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8(1), 58–65.
- Wolfrom M, Laver M, & Patin D (1961)** Carbohydrates of the coffee bean. II. Isolation and characterization of a mannan. *The Journal of Organic Chemistry*, 26(11), 4533–4535.
- Wolfrom M, & Patin D (1964)** Coffee constituents, isolation and characterization of cellulose in coffee bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12(4), 376–377.
- Wolfrom M, & Patin D (1965)** Carbohydrates of the coffee bean. IV. An arabinogalactan. *Journal of Organic Chemistry*, 30, 4060–4063.
- Wormer T (1964)** The growth of the coffee berry. *Annals of Botany*, 28(109).
- Wormer T (1966)** Shape of bean in *Coffea arabica* L. in Kenya. *Turrialba*, 16(3), 221–236
- Zheng X, & Ashihara H (2004)** Distribution, biosynthesis and function of purine and pyridine alkaloids in *Coffea arabica* seedlings. *Plant Science*, 166(3), 807–813.
- Zucker M, & Ahrens J (1958)** Quantitative assay of chlorogenic acid and its pattern of distribution within tobacco leaves. *Plant Physiology*, 33(4), 246.
- Zykwinska A, Ralet M, Garnier C, & Thibault J (2005)** Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiology*, 139, 397–407.

## **Histo-morphological and biochemical impacts of *laurina* mutation on seeds and seedlings in *Coffea arabica* L.**

### **Abstract**

*Coffea arabica* var *Laurina*, also called Bourbon pointu (BP), is a natural mutant of *C. arabica* 'Bourbon' (B). The *laurina* mutation is recessive, monolocus and Mendelian, leading to, as example, a Christmas tree shape, seeds with narrow shape and with low caffeine content.

The aim of this work was to highlight new effects of this mutation, with histological, morphological and biochemical approaches on seeds development and on young seedlings.

The histological study revealed the mesocarpic origin of parchment and the existence of endocarp in young fruits. Simultaneous fitting of growth curves of B and BP and their standardization allow comparisons of these varieties and fine study of cell wall composition over time. Thus, the qualitative traits (anatomic specificities and development stages) and quantitative observation (age) were linked. The phase of fruit growth concerned stages (St) 1-2 to 4 and fruit maturation St 5 to 7. The diversity of BP seed shape was not only linked to the absence of relationship between length and width but also to a parallel between parchment and endosperm development during stages 3 and 4. When taking in account the cell wall polysaccharide (CWP) evolution in time-course, three phases occurred:  $\phi$  1 (St 1-2, 3),  $\phi$  2 (St 3, 4 and the beginning of 5), and  $\phi$  3 (the end of St 5, St 6, 7). The two first were affected by the mutation probably through maternal effect (perisperm). In seedlings, the semi-dwarfism of the hypocotyl in light growth condition, which is an effect of the mutation, was due to a lower cell number than in B. The phytohormones content was different according the variety (ABA, auxine, cytokinins). Nevertheless, neither CWP composition nor chlorogenics acids (CQA) content were affected by the mutation, or light/darkness growth condition (expected for CQA content in roots). By contrast, the composition in CWP and CQA was different depending on organs. Finally, caffeine (CAF) content was affected by the mutation and varietal difference was present even in darkness conditions.

All together, these results represent an important step in i/ the characterization of the pleiotropic effects of the *laurina* mutation, ii/ the understanding of the cell wall evolution in seed time course, and iii/ new knowledge on seedlings through hormone, CAF and CQA contents and CWP composition.

**Key words:** *Coffea arabica*, *laurina* mutation, fruit development, seedlings, histology, cell wall polysaccharides, caffeine, chlorogenics acids, phytohormones

# Impacts histo-morphologiques et biochimiques de la mutation *laurina* sur les graines et les plantules de *Coffea arabica* L.

## Résumé

Le caféier *Coffea arabica* var. *Laurina* (Bourbon pointu, BP) est un mutant naturel de *C. arabica* var. Bourbon (B). La mutation *laurina* est récessive, monolocus et Mendélienne. Ses effets sont pléiotropiques et concernent notamment le port et la forme de l'arbre ainsi que la forme et la teneur en caféine des graines.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets de la mutation sur le développement des graines et des plantules par des approches histologiques, morphologiques et biochimiques.

L'origine mésocarpique de la parche et la distinction entre la parche et l'endocarpe du fruit ont été déterminées grâce à l'approche histologique. La standardisation préalable de la croissance en taille des graines de B et de BP était primordiale pour la comparaison fine de ces deux variétés notamment sur la composition des parois cellulaires. Ainsi les stades de développement ont été mis en relation avec l'âge des fruits et leur aspect histo-morphologique. La phase de croissance du fruit est représentée par les stades 1-2 à 4, et la phase de maturation par les stades 5 à 7. A maturité, la forme allongée des graines de BP est due à l'absence de relation entre la longueur et la largeur. Un parallèle est possible entre la parche et le développement de l'endosperme pendant les stades 3 et 4. L'étude de la composition en polysaccharides pariétaux a permis de mettre en évidence trois phases spécifiques :  $\phi$  1 (stades 1-2 et 3),  $\phi$  2 (stades 3, 4 et première partie du 5), et  $\phi$  3 (deuxième partie du stade 5, stades 6 et 7). La mutation affecte les teneurs en polysaccharides pariétaux des  $\phi$  1 et 2, probablement par le biais du péricarpe (effet maternel). Chez la plantule, la mutation affecte la longueur des hypocotyles exposés à la lumière. Le semi-nanisme de l'hypocotyle de BP par rapport à B est dû à un nombre moindre de cellules que chez B. Les teneurs en phytohormones ABA, en auxine et en cytokinines sont aussi touchées par la mutation. La composition en polysaccharides pariétaux et en acides chlorogéniques (CQA) n'est affectée ni par la mutation, ni par la présence ou l'absence de lumière pendant la croissance des plantules (sauf pour les CQA des racines). Cependant un effet-organe est mis en évidence. La mutation entraîne une réduction de la teneur en caféine (CAF) et la différence variétale subsiste à la lumière et à l'obscurité.

Ces résultats, permettant de mieux caractériser les effets pléiotropiques de la mutation *laurina*, ont été discutés. Ils constituent une avancée importante 1/ dans la compréhension de l'évolution des parois de la graine au cours de son développement et 2/ dans la caractérisation des plantules au travers des dosages d'hormones, de CAF, de CQA et des polysaccharides pariétaux.

**Mots clés :** *Coffea arabica*, mutation *laurina*, développement des fruits, plantules, histologie, polysaccharides pariétaux, caféine, acides chlorogéniques, hormones